

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

‘Βιοτεχνολογία-Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος’

**‘Κινητική μελέτη αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως
εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα’**



Ασάρτη Γιαννούλα

Λάρισα, Μαΐος 2014

University of Thessaly

Department of Biochemistry and Biotechnology

Postgraduate Studies

‘Biotechnology-Quality assessment in Nutrition and the Environment’

‘Kinetic Study of glycogen phosphorylase inhibitors as potential antidiabetic drugs’



Astarti Giannoula

Larisa, May 2014

Επιβλέπων Καθηγητής:

Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

• Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

• Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική

Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

• Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αφιερωμένο στο γιό μου, Ερμή

«Έργο της επιστήμης είναι να βάλει γεγονότα στη θέση των φαινομένων και αποδείξεις στη θέση των εντυπώσεων.»

Τζον Ράσκι

Ευχαριστίες

Θα θελα από καρδιάς να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και την ουσιαστική και διαρκή υποστήριξή του σε κάθε στάδιο προς την ολοκλήρωσή της.

Επίσης, θα θελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Καντσάδη, που ήταν δίπλα μου από την αρχή και με βοήθησε στο μέγιστο βαθμό στο πειραματικό μέρος της εργασίας μου παρέχοντάς μου την κατάλληλη καθοδήγηση. Ακόμη, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Στραβοδήμο που αφιέρωσε ιδιαίτερο χρόνο στην παροχή αρωγής προς την εξοικείωσή μου με το εργαστήριο και στην πορεία προς την επιτυχή ολοκλήρωση του πειραματικού τμήματος αυτής. Ακόμη, θα θελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στους γονείς μου που χωρίς την οικονομική και ψυχολογική υποστήριξή τους θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της εργασίας μου αλλά και στο σύζυγό μου, που η ψυχολογική του συμπαράσταση ήταν απερίοριστη.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	8
Abstract.....	9

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....

1.Σακχαρώδης Διαβήτης.....

1.1 Γενικά.....

9

1.2 Μορφές Σακχαρώδους Διαβήτη.....

12

1.3 Διάγνωση Σακχαρώδους Διαβήτη.....

16

1.4 Θεραπεία Σακχαρώδους Διαβήτη.....

17

2.1 Ινσουλίνη.....

19

2.2 Έκκριση ινσουλίνης υπό την επίδραση γλυκόζης- Δέσμευση γλυκόζης υπό την επίδραση ινσουλίνης.....

24

2.3 Υποδοχέας Ινσουλίνης.....

25

2.4 Ινσουλίνη και Γλυκαγόνη.....

26

2.5 Υπερινσουλιναιμία και Υποινσουλιναιμία.....

27

2.6 Γλυκόζη.....

28

2.7 Ρύθμιση της μεταφοράς της γλυκόζης.....

29

2.8 Γλυκογόνο.....	30
2.9 Αποικοδόμηση Γλυκογόνου.....	30
2.10 Ρόλος φωσφορικής πυριδοξάλης(PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	33
3.1 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	34
3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	39
3.3 Κέντρα σύνδεσης της GP.....	42
3.4 Ενζυμική Κινητική.....	43
3.5 Ενζυμική Αναστολή.....	46
3.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	48

Πειραματικό Μέρος

Υλικά και Μέθοδοι

1.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού.....	49
1.2 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου....	52
2.1 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten.....	54
2.2 Προσδιορισμός της σταθεράς K_i	55

2.3 Υπολογισμός της φαινόμενης K_{map} (K_m , app)....	57
2.4 Παρασκευή Τυφλών.....	61
2.5 Προσδιορισμός Φωσφόρου.....	62
2.6 Μέθοδος ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου.....	62
2.7 Μέθοδος επεξεργασίας με το Grafit.....	64
3.1 Σκοπός της εργασίας.....	65
4. Αποτελέσματα.....	66
4.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b γλυκογόνου.....	69
4.2 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....	69
4.3 Κινητική μελέτη αναστολέα.....	71
4.4 Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	72

Περίληψη

Με τον όρο **διαβήτης** περιγράφουμε αρκετές διαταραχές του μεταβολισμού. Στο διαβήτη, ο οργανισμός παράγει λιγότερη ή και καθόλου ινσουλίνη, ή τη χρησιμοποιεί με τρόπο μη αποτελεσματικό. Είναι συχνή πάθηση και χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα. Η θεραπευτική προσέγγιση έγκειται στη διατήρηση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα σε φυσιολογικά επίπεδα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται μόρια-στόχοι, όπως ένζυμα και υποδοχείς που συμβάλλουν στη ρύθμιση των επιπέδων αυτής, προκειμένου να σχεδιαστούν ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπογλυκαιμικά φάρμακα. Σύμφωνα με μελέτες, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου που παράγει γλυκόζη στο μεταβολισμό όταν τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα είναι χαμηλά, αποτελεί έναν από τους πιο αξιόλογους μοριακούς στόχους για την παραγωγή νέων αντι-διαβητικών φαρμάκων.

Στη συγκεκριμένη εργασία απομονώθηκε η μυική φωσφορυλάση b (GPb) από σκελετικούς μύες κουνελιού και χρησιμοποιώντας κινητικά πειράματα και μελέτες εξετάστηκε το ποσοστό αναστολής στη δραστηριότητα του ενζύμου της ένωσης KD030. Δείχθηκε πως αυτή η ένωση είναι ισχυρός συναγωνιστικός αναστολέας με K_i $32,49 \pm 3,17 \mu M$

Abstract

Using the term of **diabetes** mellitus we describe multiple metabolism disorders. When somebody suffers from diabetes mellitus he produces less or even no insulin or he uses it with an ineffective way. We are referring to a very common disease characterized by elevated blood glucose levels. Regarding the therapeutic target of diabetes mellitus we aim to stabilize the blood glucose levels in normal reference values. For this reason, enzymes and receptors which contribute to the glucose level regulation are used as molecular targets so as to design

compounds that can be used as hypoglycaemic drugs. According to studies, *glucogen phosphorylase* that generates glucose for metabolism when sugar levels in the blood are low, is one of the most remarkable molecular targets for the production of new anti-diabetic drugs.

In this study the rabbit muscle *glucogen phosphorylase b* (GPb) was isolated and was examined the rate of inhibition of the KD030 compound in the enzyme activity by using kinetic experiments. The results showed that this compound is a potent competitive inhibitor of the enzyme with an inhibition constant K_i $32,49 \pm 3,17 \mu\text{M}$

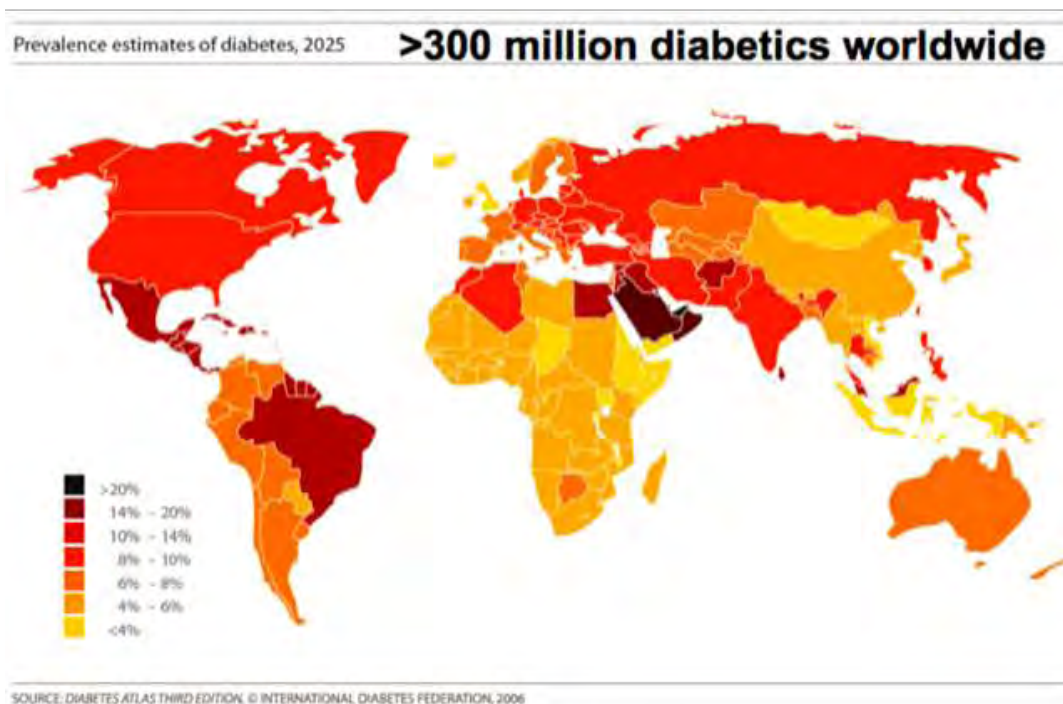
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Σακχαρώδης Διαβήτης

1.1Γενικά

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία χρόνια,εξελικτική νόσος που χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Είναι μια πάθηση που, αν και υπήρχε ανέκαθεν, απέκτησε διαστάσεις επιδημίας τις τελευταίες δεκαετίες κυρίως λόγω της αγροτικής επανάστασης που επέφερε μείωση της τιμής των τροφών κατά 10 φορές και συνεπώς επήλθε υπερκατανάλωση τροφής τόσο στον αναπτυγμένο όσο και στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Σήμερα, βάσει των τελευταίων δεδομένων της Παγκόσμιας Ομοσπονδίας (IDF) για το Διαβήτη 382 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούν με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2. Το 2035 ο αριθμός αυτός υπολογίζεται ότι θα ανέλθει σε 592 εκατομμύρια,

καθιστώντας τη νόσο ως την 7η αιτία θανάτου παγκοσμίως. Σύμφωνα με την Ελληνική Διαβητολογική Εταιρία , στον Ελλαδικό χώρο εκτιμάται ότι το 8-9% του πληθυσμού πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη , ενώ υπάρχει και ένα ποσοστό 3-4 % που δε γνωρίζει ότι έχει τη νόσο.



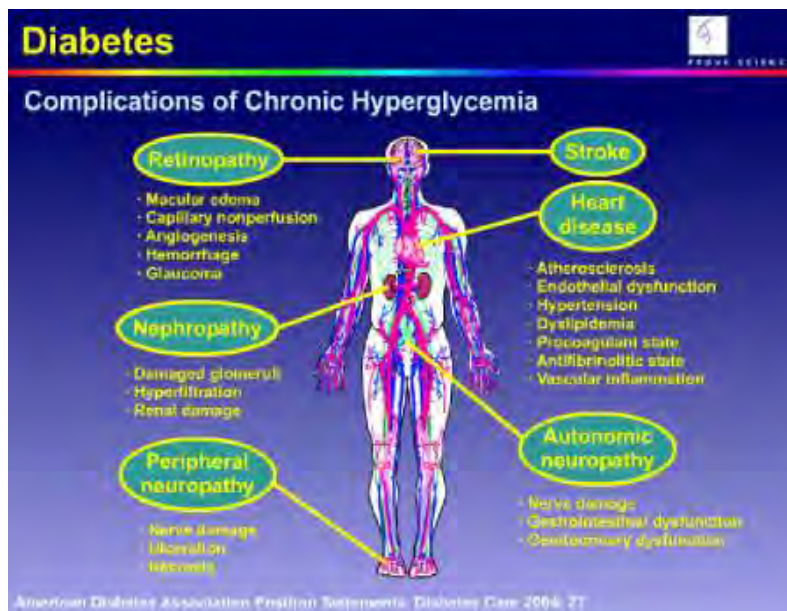
Τα άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη εμφανίζουν υπεργλυκαιμία συνέπεια διαταραχών στην έκκριση ινσουλίνης, στη δράση της ή και στα δύο. Η χρόνια υπεργλυκαιμία στον ΣΔ σχετίζεται με την πρόκληση μακροχρόνιων βλαβών, δυσλειτουργίας ή ανεπάρκειας διαφόρων οργάνων και ιδιαιτέρως των οφθαλμών, των νεφρών, των νεύρων, της καρδιάς και των αγγείων. Κατά την εμφάνιση των παρακάτω συμπτωμάτων μπορεί να υφίσταται οξεία ή χρόνια υπεργλυκαιμία, με τα τρία πρώτα να αποτελούν την κλασική υπεργλυκαιμική τριάδα: Πολυφαγία, πολυδιψία, πολυουρία, κόπωση, θολή όραση, απώλεια βάρους, αργή επούλωση πληγών, ξηροστομία, ξηρό δέρμα ή φαγούρες, απόπνοια ακετόνης (χαρακτηριστική οσμή στην αναπνοή του ασθενούς), υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, αρρυθμίες ακόμη και κόμα.

Στις οξείες επιπλοκές μπορεί να εμφανιστεί:

- διαβητική κετοξέωση και διαβητικό κώμα
- Υπερωσμωτικό μη κετωτικό κώμα και
- Υπογλυκαιμία

Στις χρόνιες επιπλοκές που μπορεί να προκαλέσει ο διαβήτης συμπεριλαμβάνονται οι:

- Διαβητική μικροαγγειοπάθεια, που προκαλεί διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, διαβητική νεφροπάθεια και νευροπάθεια αλλά και
- Διαβητική μακροαγγειοπάθεια, με εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, περιφερικών αγγειακών νόσων αλλά και αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων κυρίως ισχαιμικού τύπου.



1.2 Μορφές Σακχαρώδους Διαβήτη

1.2.1 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1(πρώην ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης, Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, IDDM)

Είναι μια μορφή διαβήτη που χαρακτηρίζεται από την αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη, με αποτέλεσμα να υπάρχει ολική έλλειψη ή ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης. Υπό αυτή την έννοια, ο ασθενής με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I είναι απόλυτα εξαρτημένος από τη εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα του να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα. Εμφανίζεται στο 15% περίπου του συνόλου των διαβητικών, εκ των οποίων οι περισσότεροι ανήκουν στο ανδρικό φύλο. Εμφανίζεται κυρίως σε νεαρά άτομα ηλικίας κάτω των 20 ετών και συνήθως εισβάλλει απότομα με την πρώτη της εκδήλωση να είναι η ανάπτυξη διαβητικής κετοξέωσης, με ναυτία, εμετό, κοιλιακό πόνο και απώλεια συνείδησης. Κατόπιν, εμφανίζονται έντονα κλινικά συμπτώματα, όπως πολυουρία, πολυδιψία, πολυφαγία και μεγάλη απώλεια βάρους σε σύντομο χρονικό διάστημα, που μπορούν να οδηγήσουν τα νεαρά κυρίως άτομα, σε διαβητικό κώμα. Ο νεανικός σακχαρώδης διαβήτης κατατάσσεται στα αυτοάνοσα νοσήματα αφού έχει βρεθεί πως σε ποσοστό 90% ευθύνεται το ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο, από γενετικό λάθος, στρέφεται εναντίων των β κυττάρων και τα καταστρέφει. Η μόνη πηγή ινσουλίνης για τον οργανισμό, τα β-κύτταρα του παγκρέατος, εκφυλίζονται πλήρως και καμία σημαντική αναγέννηση δεν γίνεται για να αντισταθμίσει τον εκφυλισμό αυτόν. Στο υπόλοιπο 10% τα αίτια δεν είναι γνωστά και χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής. Πιθανοί παράγοντες ενεργοποίησης θεωρούνται η κληρονομικότητα, διάφοροι ιοί, το στρες. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες θεωρούνται περισσότερο υπεύθυνοι κατά την ανάπτυξη Διαβήτη τύπου 1 σε άτομα πέραν της εφηβικής ηλικίας. Συνήθως υπάρχει αιφνίδια εισβολή της νόσου, με την αυτοάνοση διαδικασία να προϋπάρχει για πολύ περισσότερο χρόνο.

1.2.2 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2(μη ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης,Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM)

Ο οργανισμός ενός ανθρώπου με Διαβήτη Τύπου 2 είτε δεν παράγει αρκετή ινσουλίνη ή εμφανίζει αντίσταση στην ινσουλίνη που παράγει (μια κατάσταση που ονομάζεται «ινσουλινοαντίσταση» και κατά την οποία ενώ υπάρχει ινσουλίνη, αυτή δεν μπορεί να εισάγει τη γλυκόζη στα κύτταρα). Στην περίπτωση της ινσουλινοαντίστασης, το σώμα παράγει μεν ινσουλίνη, αλλά η δράση της είναι μειωμένη. Έτσι, η γλυκόζη δεν εισχωρεί στα κύτταρα και αυτό προκαλεί δύο κύρια προβλήματα, τη συσσώρευση της γλυκόζης στο αίμα και οδηγεί τα κύτταρα στο να μην λαμβάνουν τη γλυκόζη που χρειάζονται για την ενέργεια και την ανάπτυξη του οργανισμού.Εμφανίζεται στο 85% του συνόλου των διαβητικών ασθενών και τα ποσοστά μεταξύ των δύο φύλων δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Σε αντίθεση με τον Σ. Δ. τύπου 1,απαντάται κυρίως σε παχύσαρκους ενήλικες χωρίς, όμως, να αποκλείονται άτομα ισχνά ή νεαρής ηλικίας. Τα επίπεδα της ινσουλίνης είναι φυσιολογικά ή υψηλά και η εμφάνιση του αποδίδεται κυρίως σε κληρονομικότητα.

Η αιτιολογία του τύπου 2 διαβήτη δεν είναι γνωστή, αλλά σήμερα είναι γενικά αποδεκτό στο ότι οφείλεται σε έναν συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης και εξωτερικών-περιβαλλοντικών παραγόντων. Αυτοί οι εξωτερικοί παράγοντες είναι η μειωμένη φυσική δραστηριότητα και η αύξηση της ημερήσιας πρόσληψης θερμίδων και ειδικότερα λίπους. Αυτοί που διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο είναι οι παχύσαρκοι και υπέρβαροι, αφού η παχυσαρκία προδιαθέτει στην ανάπτυξη ινσουλινοαντοχής πιθανόν λόγω της παραγωγής από το λιπώδη ιστό ουσιών που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη,γυναίκες που έχουν εμφανίσει διαβήτη της εγκυμοσύνης, άτομα με ιστορικό ΣΔ2 στην οικογένειά τους και αυτοί που εμφανίζουν κλινικά στοιχεία του μεταβολικού συνδρόμου (υπέρταση, αύξηση της περιμέτρου της κοιλιάς, διαταραχές των λιπιδίων του αίματος),έχοντας επιπλέον ως δεδομένο πως όσο προχωράει η ηλικία το σώμα μας γίνεται λιγότερο ανεκτικό στα σάκχαρα.

1.2.3 Διαβήτης κύησης

Ως διαβήτης της κύησης (gestational diabetes) ορίζεται οποιαδήποτε διαταραχή στον μεταβολισμό της γλυκόζης (των υδατανθράκων) που διαγιγνώσκεται ή εμφανίζεται για πρώτη

φορά στην κύηση, συνήθως στο τέλος του δευτέρου τριμήνου, μετά την 24η εβδομάδα. Κάθε κύηση είναι δυνητικά διαβητογόνος. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ο πλακούντας παράγει ορμόνες που βοηθούν το έμβρυο να μεγαλώσει. Οι ορμόνες αυτές κάνουν πιο δύσκολη τη δράση της ινσουλίνης στο σώμα (προκαλούν αντίσταση στην ινσουλίνη). Στις γυναίκες με διαβήτη κύησης το πάγκρεας δεν μπορεί να ανταπεξέλθει σ' αυτές τις αυξημένες ανάγκες, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Έχει παρατηρηθεί ότι το ποσοστό των γυναικών που βρίσκονται αντιμέτωπες με αυτή την κατάσταση στη διάρκεια της εγκυμοσύνης τους είναι περίπου 3-6%, με όσες διαθέτουν ιστορικό διαβήτη στην οικογένεια, είναι παχύσαρκες ή έχουν ηλικία μεγαλύτερη των 35 ετών να μπαίνουν συχνότερα στο στόχαστρο της ασθένειας. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις δεν χρειάζεται κανένας «επιβαρυντικός» παράγοντας για να εμφανιστεί.

Η εμφάνιση διαβήτη κύησης μπορεί να οδηγήσει σε ιδιαίτερα δυσάρεστες επιπλοκές αρχικά για το έμβρυο, όπως μικροσωμία, σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας και υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια του νεογνού, ωμική δυστοκία, αιφνίδιο ενδομήτριο και περιγεννητικό θάνατο όπως και μεταβολικές επιπλοκές όπως ίκτερος, υπογλυκαιμία, πολυερυθραιμία. Παράλληλα όμως αυτός ο τύπος διαβήτη συσχετίζεται και με μακροχρόνιες επιπλοκές στη μετέπειτα παιδική ηλικία, όπως παχυσαρκία, διαταραχή γλυκόζης νηστείας και διαβήτη τύπου 2 αλλά και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Στις επιπλοκές που αφορούν στη μητέρα εντάσσονται η προεκλαμψία, η υπέρταση κύησης, ο τραυματισμός κατά την κύηση αλλά και η αναγκαιότητα διενέργειας καισαρικής τομής.

1.1 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ

Στα αρχικά στάδια της νόσου δεν υπάρχουν συμπτώματα, γεγονός που καθιστά τη διάγνωση δύσκολη και δυνατή μόνο μέσα από τη διαδικασία προληπτικού ελέγχου. Παράλληλα εμφανίζονται και γενικά συμπτώματα όπως εύκολη κόπωση κ.λπ. Συχνά, όταν γίνεται η διάγνωση της νόσου, ο ασθενής παρουσιάζει ήδη εγκατεστημένες επιπλοκές, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχει γίνει καθυστερημένη διάγνωση (από μελέτες φαίνεται ότι το

χρονικό διάστημα από την άνοδο του σακχάρου στο αίμα μέχρι τη στιγμή της διάγνωσης φτάνει έως τα 6 χρόνια). Ως διαγνωστικά κριτήρια λοιπόν θεωρούνται:

a) **η τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c).** Χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη αλλά και για την παρακολούθηση της ρύθμισης του σακχάρου αίματος, αφού αντικατοπτρίζει τη μέση τιμή σακχάρου αίματος τους τελευταίους 3 μήνες πριν την εξέταση. **Τιμές HbA1c < 6% θεωρούνται ενδεικτικές καλού γλυκαιμικού ελέγχου**

b) **Καμπύλη σακχάρου:** Τιμή σακχάρου 2 ώρες μετά από φόρτιση με 75g γλυκόζης από του στόματος > 200mg/dl. Η συγκεκριμένη εξέταση απαιτεί τριήμερη προετοιμασία, με διαιτολόγιο πλούσιο σε υδατάνθρακες και ο γιατρός μετρά τα επίπεδα του σακχάρου διαδοχικά ανά 30 λεπτά, τις επόμενες 2 ή 3 ώρες. Οι διαγνωσμένοι διαβητικοί δεν έχουν λόγο να κάνουν αυτή την εξέταση, η οποία όμως είναι πολύ χρήσιμη για άτομα με κληρονομικό ιστορικό.

c) **Τιμή σακχάρου νηστείας** (που λαμβάνεται δηλαδή μετά από 8 τουλάχιστον ώρες αποχής από την πρόσληψη τροφής) > 126mg/dl

d) **Παρουσία κλασσικών συμπτωμάτων του διαβήτη ή διαβητικής κετοξέωσης ή υπεροσμωτικού υπεργλυκαιμικού μη κετωτικού κόματος και τιμή γλυκόζης σε οποιαδήποτε στιγμή > 200mg/dl**

1.1.1 ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ

Γενικά άτομα που δεν έχουν μεν συμπτώματα αλλά είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι με τουλάχιστον ένα από τα **κάτωθι χαρακτηριστικά** πρέπει να ελέγχουν τα επίπεδα σακχάρου μια φορά το χρόνο για υπόνοια ανάπτυξης σακχαρώδους διαβήτη. Αντιθέτως, άνθρωποι με φυσιολογικό βάρος χωρίς κανένα από τα άλλα χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν πρέπει να ελεγχθούν στα 45 τους και αν οι τιμές είναι φυσιολογικές έπειτα από 3 χρόνια:

- a) Σωματική αδράνεια.
- b) Οικογενειακό ιστορικό (1ου βαθμού συγγενής με διαβήτη).
- c) Αυξημένα επίπεδα πίεσης (πάνω από 140/90mmHg).

- d) Μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης (κάτω από 35 mg%) ή αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (πάνω από 250 mg%).
- e) Ιστορικό διαβήτη κύησης (σε γυναίκες).
- f) Ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου.
- g) Ιστορικό πολυκυστικών ωοθηκών (στις γυναίκες).
- h) Ιστορικό γέννας παιδιού με βάρος γέννησης πάνω από 4,5 κιλά (στις γυναίκες).
- i) Ιστορικό προδιαβήτη σε προηγούμενη εξέταση.

Σε παιδιά και εφήβους δίχως συμπτώματα (ασυμπτωματικά) ελέγχουμε το σάκχαρο αίματος τουλάχιστον κάθε 3 χρόνια όταν το παιδί ή ο έφηβος είναι υπέρβαρος και παράλληλα διαθέτει δύο ακόμα από τα χαρακτηριστικά που ακολουθούν:

- a) Οικογενειακό ιστορικό (1ου βαθμού συγγενής με διαβήτη).
- b) Σημεία ύπαρξης αντίστασης στην ινσουλίνη (υπέρταση, πολυκυστικές ωοθήκες, δυσλιπιδαιμία, μελανίζουσα ακάνθωση ή μικρό βάρος γέννησης).
- c) Ιστορικό διαβήτη κύησης της μητέρας.

Η έναρξη του ελέγχου γίνεται σε ηλικία 10 ετών ή στην ηλικία έναρξης της εφηβείας και επαναλαμβάνεται κάθε 3 χρόνια.

1.2 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη ποικίλει και καθορίζεται από το βαθμό της διαταραχής της έκκρισης της ινσουλίνης. Οι στόχοι της επεμβατικής παρέμβασης είναι: η εξάλειψη των συμπτωμάτων που προκαλεί η υπογλυκαιμία, η πρόληψη, η έγκαιρη διάγνωση και η επιτυχής αντιμετώπιση των επιπλοκών. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν :

- a) **Μη φαρμακευτική αντιμετώπιση** με τη χορήγηση μιας διαιτητικής αγωγής. Η χορήγηση υποθερμидικής διαίτας και σωστής κατανομής των γευμάτων οδηγεί σε μείωση

της ινσουλινοαντοχής και σε βελτίωση των επιπέδων γλυκόζης. Παράλληλα, η σωματική άσκηση κρίνεται απαραίτητη τόσο για τη ρύθμιση του σωματικού βάρους όσο και για τη βελτίωση των επιπέδων της γλυκόζης. Στα άτομα με διαβήτη τύπου II κατά τη διάρκεια της άσκησης ή μετά μειώνεται το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα, επειδή χρησιμοποιείται γλυκόζη για εξοικονόμηση ενέργειας. Με την άσκηση, αυξάνεται το ποσοστό μυϊκής μάζας στο σώμα. Οι μυς χρησιμοποιούν τη γλυκόζη ως ενεργειακή πηγή ακόμη και όταν ξεκουράζονται και έτσι χαμηλώνει το επίπεδο σακχάρου. Επιπλέον, τα μυϊκά κύτταρα γίνονται πιο ευαίσθητα στην ινσουλίνη κι έτσι αποθηκεύουν και χρησιμοποιούν καλύτερα τη γλυκόζη για τη λήψη ενέργειας. Ακόμη, η άσκηση βοηθάει στην απώλεια βάρους και στη διατήρηση των ιδανικών κιλών, γεγονός που βελτιώνει τον έλεγχο του σακχάρου και μειώνει τις τιμές του.

b) **Φαρμακευτική αγωγή με χορήγηση ινσουλίνης:** Η ινσουλίνη είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ασθενούς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I. Σε ότι αφορά τον τύπο II η ινσουλίνη δεν αποτελεί θεραπευτική επιλογή πρώτης γραμμής. Τα σκευάσματα της διακρίνονται ανάλογα με τη διάρκεια δράσης και τη συγκέντρωσή τους. Υπάρχουν ινσουλίνες άμεσης και ταχείας δράσης, ενδιάμεσης και παρατεταμένης. Το θεραπευτικό σχήμα εξατομικεύεται ανάλογα με τις ανάγκες του ασθενούς

c) **Φαρμακευτικά σκευάσματα,** τα οποία αποτελούν θεραπεία πρώτης γραμμής για τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Τα αντιδιαβητικά δισκία διαφέρουν σημαντικά από την ινσουλίνη και χρησιμοποιούνται συνήθως από άτομα με τύπου II διαβήτη. Λέγοντας αντιδιαβητικά δισκία εννοούμε χάπια που λαμβάνονται από το στόμα και μπορούν με τη δράση τους να ελαττώσουν το σάκχαρο του αίματος:

- **Σουλφονουλουρίες** όπου η δράση τους έγκειται στην αύξηση της έκκρισης της ινσουλίνης μέσω της σύνδεσής τους με ειδικό υποδοχέα του β-κυττάρου. Δεν μεταβάλουν το λιπιδαιμικό προφίλ, προκαλούν αύξηση του σωματικού βάρους και έχουν έντονη υπογλυκαιμική δράση.

- **Μεγλιτινίδες** που προκαλούν έκκριση ινσουλίνης όταν η γλυκόζη του πλάσματος αυξηθεί. Οδηγεί σε αύξηση του σωματικού βάρους, δεν επιδρούν στο λιπιδαιμικό προφίλ και συνδυάζονται με μικρότερο ποσοστό υπογλυκαιμιών.

- **Διγουανίδια** που δρουν ελαττώνοντας την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ και αυξάνοντας την ευαισθησία των μυών στην ινσουλίνη. Δεν προκαλούν αύξηση του σωματικού βάρους και υπογλυκαιμίες. Συνδυάζονται με γαστρεντερικές διαταραχές και γαλακτική οξέωση.

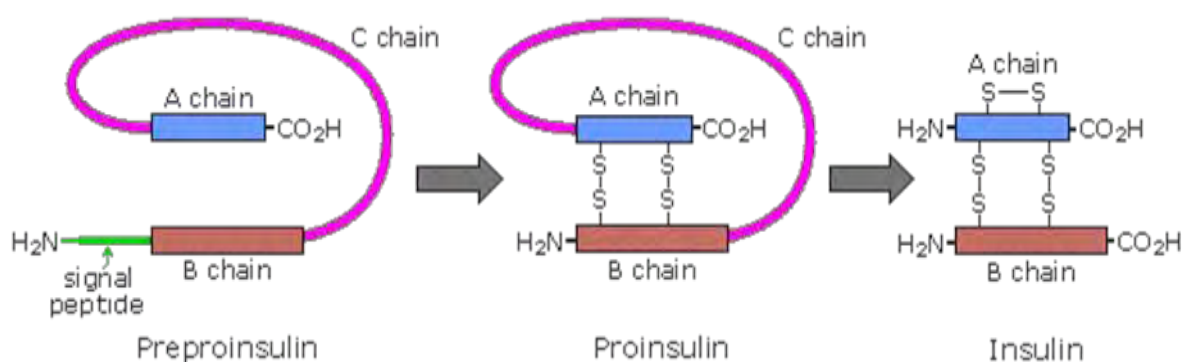
- **Αναστολείς των α-γλυκοσιδασών** με κύριο εκπρόσωπο τη ακαρβόζη η οποία ανταγωνίζεται τη δράση των α-γλυκοσιδασών, ενζύμων που διασπούν τους ολιγοσακχαρίτες στο λεπτό έντερο. Έτσι καθυστερείται η απορρόφηση της γλυκόζης και επιβραδύνεται η είσοδος της στη συστηματική κυκλοφορία. Οι παρενέργειες τους είναι κυρίως γαστρεντερικές.

2.1 Ινσουλίνη

Γενικά

Η ινσουλίνη είναι μια πρωτεϊνική ορμόνη και συντίθεται στα β-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans του παγκρέατος. Τα κύτταρα αυτά πρώτα παράγουν ένα πρόδρομο μόριο, την προϊνσουλίνη, που αποτελείται από τρεις περιοχές, μια αμινοξική Β αλυσίδα, μια καρβοξυτελική Α αλυσίδα και ένα συνδετικό πεπτίδιο στο κέντρο γνωστό ως πεπτίδιο C. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την προπροϊνσουλίνη, που είναι το αρχικό πρόδρομο μόριο της ινσουλίνης, εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 και βρίσκεται σε στενή σχέση με το γονίδιο του IGF-2 (Insulin-Like growth factor-2). Εντός του ενδοπλασματικού δικτύου η προϊνσουλίνη εκτίθεται στη δράση αρκετών ειδικών ενδοπεπτιδασών, οι οποίες κόβουν το C πεπτίδιο και αφήνουν το αμινοτελικό Β πεπτίδιο συνδεδεμένο με δισουλφιδικούς δεσμούς με το καρβοξυτελικό Α πεπτίδιο παράγοντας έτσι την ώριμη μορφή της ινσουλίνης (εικόνα 2) [Lehninger, 2008]. Το μόριο της ινσουλίνης είναι πολυπεπτίδιο και αποτελείται από 51 αμινοξέα, που συγκροτούν τις δύο αλυσίδες Α και Β και συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Το μόριό της έχει τρισδιάστατη δομή και η χημική δομή της έχει ορισμένες

συνέπειες για τη θεραπευτική χρήση της, όπως το ότι το μόριό της πέπτεται τελείως στο έντερο και ως εκ τούτου καθίσταται τελείως ανενεργή κατά τη χορήγησή της από το στόμα. Το μοριακό της βάρος είναι 5808 Da και είναι αρκετά μεγάλο για να απορροφηθεί από το επιθήλιο της βλεννογόνου. Ακόμη και στη μονομερή μορφή του το μέγεθος του μορίου καθιστά δυσχερή και βραδεία τη διάχυσή του μέσω των πόρων των τριχοειδών ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις όπως γίνεται στον υποδόριο ιστό, αφού ενεθεί, σχηματίζει διμερή άρα επιβραδύνεται περαιτέρω η απορρόφησή της.[Stryer,1997].



Εικόνα 2: Η ινσουλίνη αρχικά συντίθεται ως μία προ-πρωτεΐνη με 105 κατάλοιπα. Το σηματοδοτικό πεπτίδιο των 24 αμινοξέων απομακρύνεται δίνοντας ένα πεπτίδιο προ-ινσουλίνης. Αυτό διπλώνει και σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των κυστεϊνών 7 και 67 και μεταξύ των 19 και 80. Τέτοια διμερή κυστεϊνών ενώνονται με ένα δισουλφιδικό δεσμό, ονομάζονται κυστίνες. Μια πρωτεάση, στη συνέχεια αποκόπτει το πεπτίδιο στην Arg31 και arg60, με την απώλεια της αλληλουχίας 32-60 (αλυσίδα C). Η απομάκρυνση της Arg31 οδηγεί στο σχηματισμό της ώριμης ινσουλίνης, με τις αλυσίδες A και B να συγκρατούνται μαζί με δισουλφιδικούς δεσμούς και μία τρίτη χαρακτηριστική ομάδα κυστίνης στην αλυσίδα A.

Ο κύριος ρυθμιστής της έκκρισης της ινσουλίνης στα θηλαστικά είναι η συγκέντρωση γλυκόζης αίματος. Τα β-κύτταρα είναι πολύ ευαίσθητα ακόμα και σε μικρές μεταβολές της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Συγκεκριμένα, όταν η γλυκόζη είναι < από 90 mg/dl ο ρυθμός έκκρισης της ινσουλίνης δεν επηρεάζεται, ενώ σε συγκεντρώσεις γλυκόζης από 90-300mg/dl εμφανίζεται η μέγιστη αύξηση του ρυθμού έκκρισης με ημιμέγιστη διέγερση στα 145 mg/dl [Johnstone Mt, Venes A, 2005]. Η γλυκόζη μεταφέρεται μέσα στα β-κύτταρα μέσω γλυκοζομεταφορέων, των GLUT-2, που επιτρέπουν τη γρήγορη εξίσωση των εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων της. Η εισερχόμενη γλυκόζη για να διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης πρέπει να μεταβολισθεί. Αρχικά φωσφορυλιώνεται από τη γλυκοκινάση

που δρα σαν αισθητήρας γλυκόζης ρυθμίζοντας την έκκριση της ινσουλίνης με βάση τα υπάρχοντα επίπεδα γλυκόζης. Από το μεταβολισμό της γλυκόζης παράγεται ATP που προκαλεί κλείσιμο των ATP-ευαίσθητων διαύλων καλίου που βρίσκονται στη μεμβράνη του β-κυττάρου. Έτσι αποτρέπεται η απώλεια K^+ από το β-κύτταρο με αποτέλεσμα την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης που κατόπιν προκαλεί το άνοιγμα μεμβρανικών διαύλων ασβεστίου και είσοδο Ca^{2+} μέσα στο κύτταρο. Η αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου πυροδοτεί τη μετακίνηση και εξωκύττωση των εκκριτικών κοκκίων.

Η έκκριση της ινσουλίνης δεν εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση της γλυκόζης, αλλά και από τον ρυθμό που αυτή η συγκέντρωση μεταβάλλεται. Όταν υπάρχει βραδεία αύξηση στα επίπεδα της γλυκόζης εμφανίζεται παράλληλη αύξηση του ρυθμού έκκρισης της ινσουλίνης. Ωστόσο, σε απότομη αύξηση της γλυκόζης σε υψηλά επίπεδα η έκκριση της ινσουλίνης ακολουθεί διφασική πορεία. Αυτή χαρακτηρίζεται αρχικά από μία ταχεία αύξηση που ονομάζεται 1^η φάση και ακολουθείται στη συνέχεια από μία μικρότερης έντασης και μεγαλύτερης διάρκειας αύξηση στην έκκριση της ινσουλίνης που ονομάζεται 2^η φάση. Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης η 1^η φάση διαρκεί περίπου 5 min, ενώ η 2^η φάση αρχίζοντας 10 – 20 min μετά την ενδοφλέβια έγχυση διαρκεί αρκετές ώρες. Σε από του στόματος χορήγηση γλυκόζης η διαφορά ανάμεσα στις δύο φάσεις δεν είναι τόσο ξεκάθαρη με την 1^η φάση να διαρκεί περίπου 30 min. Η ικανότητα των β-κυττάρων να ανταποκρίνονται ταχέως σε απότομη αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης θεωρείται ουσιώδης για την ομοιόσταση της γλυκόζης και η απώλεια της χρησιμοποιείται σαν πρώιμο σημείο δυσλειτουργίας των β-κυττάρων ή ακόμα και σαν προγνωστικό σημείο εμφάνισης ΣΔ τύπου 2 [Allan Gaw, Michael J. Murphy, 2004]

Γενικώς, η ινσουλίνη έχει αρκετές μεταβολικές, αγγειακές και άλλες δράσεις. Παίζει πρωτεύοντα ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων (σακχάρων) του οργανισμού. Η ινσουλίνη δρα σε όλους τους ιστούς του σώματος (ιδιαίτερα όμως στο ήπαρ, στους μύες και στο λιπώδη ιστό), συμμετέχοντας μαζί με τη γλυκαγόνη στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα. Εκτός από αυτή τη λειτουργία της για τη ρύθμιση της γλυκόζης η ινσουλίνη εμπλέκεται και στην διατήρηση επαρκών ενεργειακών αποθεμάτων ούτως ώστε να

καθίσταται εφικτή η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή. Διεγείρει τη λιπογένεση, αναστέλλει τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό, την κετονογένεση, την ηπατική γλυκογονόλυση, τη γλυκονεογένεση, την απελευθέρωση γλυκόζης και την πρωτεόλυση στους μυς.

2.1.2 Κατάσταση Νηστείας

Αφού προηγηθεί ολονύκτια νηστεία, η πτώση της ινσουλίνης και η αύξηση της γλυκαγόνης του πλάσματος μετακινούν την ομοιόσταση των ενεργειακών ουσιών από την αποθήκευση, στην παραγωγή ενέργειας. Σ' αυτό το στάδιο δεν εισέρχεται καθόλου γλυκόζη στην κυκλοφορία από το γαστρεντερικό σωλήνα και η γλυκόζη που είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας προέρχεται κυρίως από τη διάσπαση του ηπατικού γλυκογόνου, αλλά και από τη γλυκονεογένεση μέσω γαλακτικού, αμινοξέων και γλυκερόλης, μία διαδικασία που λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ και κατά δεύτερο λόγο στους νεφρούς και το έντερο.

Στην πρώτη φάση της νηστείας, το γλυκογόνο αποτελεί την κύρια πηγή της γλυκόζης που εισέρχεται στην κυκλοφορία. Έχει υπολογισθεί ότι τα 70 με 80 g ηπατικού γλυκογόνου τροφοδοτούν με γλυκόζη τον εγκέφαλο και τους περιφερικούς ιστούς για 12 με 16 ώρες. Δύο γεγονότα επιτρέπουν τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης μέχρι αυτό το διάστημα : α) οι μύες και άλλοι ιστοί αρχίζουν να χρησιμοποιούν λίπη αντί για γλυκόζη για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών τους και β) η ηπατική γλυκονεογένεση, η οποία επίσης διεγείρεται από τα λιπαρά οξέα, αντικαθιστά τη γλυκογονόλυση σαν την κύρια πηγή παραγωγής γλυκόζης. Επιπλέον, δύο παράγοντες διεγείρουν τη διάσπαση των τριγλυκεριδίων του λιπώδους ιστού κατά τη διάρκεια της νηστείας : η πτώση των επιπέδων της ινσουλίνης και η αύξηση των επιπέδων της νοραδρεναλίνης. Τα απελευθερούμενα λιπαρά οξέα καταναλώνονται κατά κύριο λόγο στον μυϊκό ιστό και στο ήπαρ.

2.1.3 Συνοπτικά η δράση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό

Η δράση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των υδατανθράκων συνοψίζεται ως: [1] Αύξηση της μεταφοράς γλυκόζης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο μυϊκό και λιπώδη ιστό και αύξηση της γλυκόλυσης. Η αύξηση της ινσουλίνης στη μεταφορά γλυκόζης είναι σημαντική για την κυτταρική επιβίωση και είναι πάντα μειωμένη σε καταστάσεις αντίστασης των ιστών στην ινσουλίνη (όπως, στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2). [2] Αύξηση της σύνθεσης γλυκογόνου στο μυϊκό και λιπώδη ιστό στο ήπαρ. Με τη δράση της ινσουλίνης, η γλυκόζη αποθηκεύεται μετά τα γεύματα υπό μορφή γλυκογόνου και μετά από πολύωρη νηστεία ή άσκηση οι ιστοί χρησιμοποιούν γλυκόζη από το γλυκογόνο του ήπατος και των μυών αντίστοιχα, οπότε και μειώνονται τα αποθέματα. [3] Μείωση της διάσπασης γλυκογόνου (γλυκογονόλυση) και της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ.

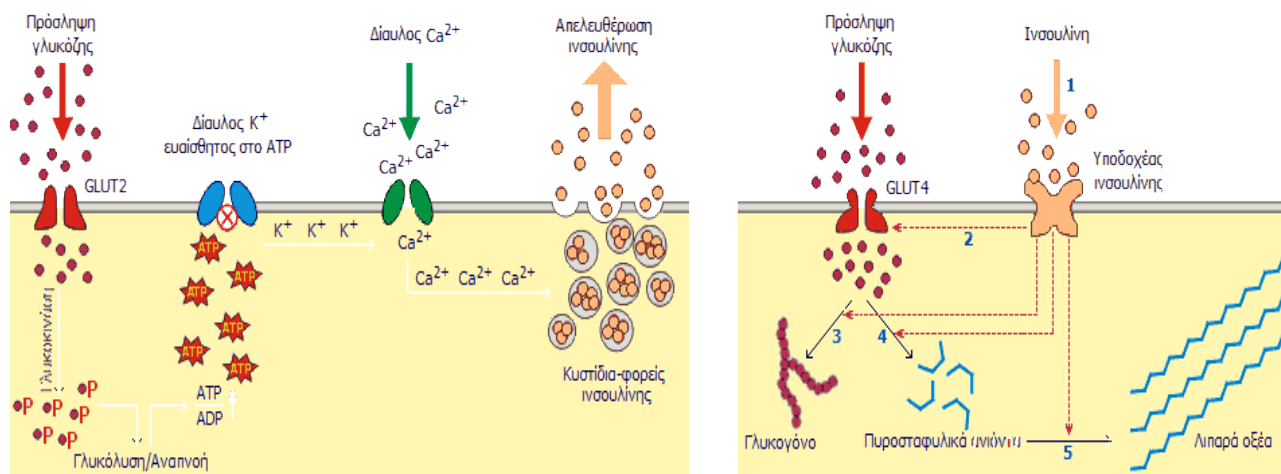
Στο μεταβολισμό των λιπιδίων η δράση της ινσουλίνης ασκείται με τους εξής μηχανισμούς: [1] Μείωση της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό, με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα. Στο ήπαρ τα ελεύθερα λιπαρά οξέα διεγείρουν τη γλυκονεογένεση ενώ στους μυς οξειδώνονται και παρεμποδίζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης, άρα αν για οποιοδήποτε λόγο αυξηθεί η λιπόλυση, θα προκληθεί αύξηση της ενδογενούς παραγωγής γλυκόζης και μείωση της περιφερικής κατανάλωσης γλυκόζης, με αποτέλεσμα την υπεργλυκαιμία. [2] Αύξηση της δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL). Το ένζυμο αυτό διασπά τα τριγλυκερίδια του αίματος σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη και μέσα στα λιποκύτταρα, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα επανεστεροποιούνται σε τριγλυκερίδια. Έτσι απομακρύνονται τα τριγλυκερίδια από την κυκλοφορία μετά τα γεύματα και ενσωματώνονται στις αποθήκες του λιπώδους ιστού.

Στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, ο ρόλος της ινσουλίνης είναι η αύξηση της μεταφοράς αμινοξέων και της σύνθεσης πρωτεϊνών στο μυϊκό, λιπώδη ιστό και ήπαρ και μείωση της αποδόμησης των πρωτεϊνών κυρίως στο μυϊκό ιστό. Η ινσουλίνη ευνοεί τη μεταφορά αλλά και την ενσωμάτωση των αμινοξέων στις κυτταρικές πρωτεΐνες αναστέλλοντας ταυτόχρονα τη διάσπαση των πρωτεϊνών. Συνεπώς, αυξάνεται έτσι η σύνθεση των πρωτεϊνών που είναι μία καθοριστική παράμετρος για τον καθορισμό του αναβολικού χαρακτήρα της ινσουλίνης. Η στοματική χορήγηση αμινοξέων διεγείρει την έκκριση

ινσουλίνης[Porksen et al.,2002]. Έρευνες έχουν δείξει πως η αργινίνη προκαλεί την έκκρισή της στο βασικό στάδιο (νηστείας) 2-10 λεπτά μετά την απορρόφησή της [Kahn et al.,1997]

2.2 Έκκριση ινσουλίνης υπό την επίδραση γλυκόζης / Δέσμευση γλυκόζης υπό την επίδραση ινσουλίνης

Υπάρχει μια μοναδική αλληλοεξάρτηση μεταξύ των μορίων γλυκόζης και ινσουλίνης. Η ινσουλίνη παράγεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος όταν αυτά δεχθούν την επίδραση της γλυκόζης, ενώ τα μυικά και λιπώδη κύτταρα αρχίζουν να προσλαμβάνουν γλυκόζη όταν δεχθούν την επίδραση της ινσουλίνης. Στην παρακάτω εικόνα περιγράφονται οι εμπλεκόμενοι με τα παραπάνω μηχανισμοί:



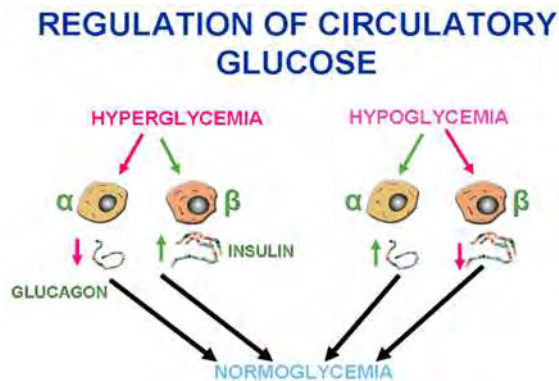
Εικόνα: Αριστερά: Μηχανισμός έκκρισης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος: Γλυκόζη από το αίμα μεταφέρεται στο κύτταρο μέσω των μεταφορέων (transporter) GLUT2. Η γλυκόζη υπόκειται σε γλυκολυτική φωσφορύλωση και εισέρχεται στον αναπνευστικό κύκλο, ενώ παράγεται ΑΤΡ (τριφωσφορική αδενοσίνη), στην οποία αποθηκεύεται "χημική ενέργεια" και αυξάνεται ο λόγος ΑΤΡ/ΑΔΡ στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση αυτή "κλειδώνει" τον διάλυο ιόντων καλίου αποπολώνοντας την κυτταρική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη διάνοιξη του διαύλου ιόντων ασβεστίου και στο κύτταρο εισέρχονται ιόντα ασβεστίου. Η αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου προκαλεί την εξωκυτταρική έκλυση ινσουλίνης από τα κυστίδια παρακαταθήκης της. Στους ασθενείς με διαβήτη τύπου Ι (ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης), ο μηχανισμός αυτός δεν υφίσταται, αφού τα β-κύτταρα ουσιαστικά έχουν "αυτοκαταστραφεί".

Δεξιά: Πρόσληψη γλυκόζης από μυϊκά και λιπώδη κύτταρα και μεταβολισμός της: Μόλις το μόριο της ινσουλίνης "προσδεθεί" στους υποδοχείς ινσουλίνης του κυττάρου, μέσω χημικών σημάτων από τον υποδοχέα ενεργοποιείται ο μεταφορέας γλυκόζης GLUT4 που επιτρέπει την είσοδο γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα. Ανάλογα με τη φύση του κυττάρου ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί σύνθεσης γλυκογόνου και γλυκόλυσης. Η εισερχόμενη γλυκόζη υπόκειται σε γλυκόλυση, δηλαδή διασπάται προς πυροσταφυλικά ανιόντα (4) και η εκλυόμενη ενέργεια αποθηκεύεται ως ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη). Στη συνέχεια τα πυροσταφυλικά ανιόντα χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων. Στον διαβήτη τύπου II (μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης ενηλίκων) τα χημικά σήματα από τη δέσμευση της ινσουλίνης είναι ανεπαρκή και σε προχωρημένα στάδια δεν υφίσταται ούτε ο μηχανισμός παραγωγής ινσουλίνης. Και στις δύο περιπτώσεις διαβήτη παύει η πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσής της στο αίμα.

2.4 Ινσουλίνη και Γλυκαγόνη

Μιλώντας για τη γλυκαγόνη κάνουμε λόγο για μια ορμόνη που συντίθεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans του παγκρέατος. Αντιρροπεί τις δράσεις της ινσουλίνης, κινητοποιώντας τα αποθέματα γλυκογόνου στο ήπαρ. Η έκκριση της γλυκαγόνης διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος (υπογλυκαιμία). Αντίθετα, η έκκριση γλυκαγόνης αναστέλλεται, όταν το σάκχαρο του αίματος είναι αυξημένο. Επίσης, την έκκριση γλυκαγόνης ενισχύουν ορισμένα αμινοξέα της τροφής και η μυϊκή δραστηριότητα, κατά τη διάρκεια της οποίας αυξάνεται η κατανάλωση της γλυκόζης του αίματος. Η γλυκαγόνη διασπά το αποταμιευμένο γλυκογόνο στο ήπαρ και τους μυς σε γλυκόζη πυροδοτώντας τον καταρράκτη αντιδράσεων της κυκλικής AMP, που οδηγεί στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και στην αναστολή της συνθάσης του γλυκογόνου για να μετατραπεί η 6-φωσφορική γλυκόζη σε γλυκογόνο. Με τον τρόπο αυτό αυξάνει τη στάθμη της γλυκόζης του αίματος. Παράλληλα, προωθεί τη διαδικασία της γλυκονεογένεσης, της μετατροπής δηλαδή στο ήπαρ των αμινοξέων σε γλυκόζη, γεγονός που αυξάνει περαιτέρω τη γλυκόζη του αίματος. Η έκκριση γλυκαγόνης ως απόκριση των γευμάτων εξαρτάται από το τί τρώμε. Όταν μιλάμε για ένα γεύμα που στηρίζεται σε υδατάνθρακες, τα επίπεδα γλυκαγόνης στο αίμα πέφτουν για να εμποδίσουν τα επίπεδα γλυκόζης να ανέβουν πολύ ψηλά. Σε ένα πρωτεϊνούχο γεύμα, τα επίπεδα γλυκαγόνης

αυξάνουν. Η χορήγησή της λοιπόν εξωγενώς, μπορεί να προκαλέσει αυξημένη απελευθέρωση γλυκόζης από το ήπαρ και συνεπώς να οδηγήσει σε ανάταξη της υπογλυκαιμίας [Εικόνα 3]. Άρα η έγκαιρη ένεση γλυκαγόνης μπορεί να αποτελέσει μια πραγματική «ζώνη ασφαλείας» για τις περιπτώσεις σοβαρής υπογλυκαιμίας.



Εικόνα : Η αντίθετη δράση ινσουλίνης-γλυκαγόνης

2.5 Υπερινσουλιναιμία και Υποινσουλιναιμία

Η υπερβολική έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας λέγεται υπερινσουλιναιμία και προκαλεί υπογλυκαιμία. Η υπερινσουλιναιμία μπορεί να προκληθεί είτε από το σύνδρομο συγγενούς υπερινσουλιναιμίας ή από γενετικά σύνδρομα μικροέλλειψης ή μετάλλαξης ενζύμων είτε από ινσουλίνωμα (αδένωμα-καρκίνωμα παγκρέατος) ή και από τη νόσο του Addison (όγκος επινεφριδίων που προκαλεί αύξηση γλυκόζης και αυξημένες ανάγκες σε ινσουλίνη). Δεν είναι η αιτία της ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2 όπως θεωρείται από πολλούς αλλά ένα σύμπτωμα της ασθένειας. Στην υπογλυκαιμία, το νευρικό σύστημα παύει να τροφοδοτείται ενεργειακά με γλυκόζη, οπότε εμφανίζονται συμπτώματα όπως ίλιγγοι, ταραχή, αδυναμία σωστής ομιλίας, λιποθυμία. Η λιποθυμία συχνά αναφέρεται ως υπογλυκαιμικό κόμα και αποτελεί κατάσταση που μπορεί να απειλήσει τη ζωή.

Σε περίπτωση ύπαρξης μειωμένης ινσουλίνης μπορεί να ενοχοποιείται η μειωμένη ανταπόκριση των β κυττάρων του παγκρέατος ή η πλήρης καταστροφή αυτών, σε πιθανή αποδόμησή της στο ήπαρ ή ακόμη και σε διαφόρων τύπων δομικών ανωμαλιών στο μόριο της ινσουλίνης. Μια μειωμένη ανταπόκριση στην ορμόνη στους περιφερικούς ιστούς, όπως στους μύες και το ήπαρ προκαλεί μειωμένη απορρόφηση της γλυκόζης στους ιστούς αυτούς που οδηγούν έτσι αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία). Δηλαδή, ενώ είμαστε σε θέση να παράγουμε ινσουλίνη, τα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται. Αυτό σημαίνει ότι η γλυκόζη παραμένει στο αίμα και συσσωρεύεται. Η παραπάνω κατάσταση (ανεπάρκεια ινσουλίνης) χαρακτηρίζει το σακχαρώδη διαβήτη [Φυσιολογία Σμολκοβίτη 2004].

2.6 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι ένα απλό σάκχαρο και αποτελεί το τελικό προϊόν του καταβολισμού των υδατανθράκων.. Είναι μια αλδόζη με 6 άτομα άνθρακα συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Ο χημικός της τύπος είναι $C_6H_{12}O_6$ και οι πέντε υδροξυλικές (OH) της ομάδες είναι τοποθετημένες με ένα ειδικό τρόπο κατά μήκος των έξι ατόμων άνθρακα του κορμού της. Στη φύση συναντούμε τη γλυκόζη αποκλειστικά με τη D-μορφή τους, που βρίσκονται σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Η D-γλυκόζη απαντά σε δύο κυκλικές μορφές με εξαμελή δακτύλιο που είναι απομονώσιμες και για να διακριθούν από τα άλλα διαστερεομερή καλούνται ανωμερή. Τα ανωμερή της γλυκόζης χαρακτηρίζονται ως α -D-γλυκόζη και β -D-γλυκόζη (ή πιο σωστά α -D-γλυκοπυρανόζη και β -D-γλυκοπυρανόζη).



Η γλυκόζη είναι ένα είδος σακχάρου που βρίσκεται κυρίως στα αμυλούχα τρόφιμα (ψωμί, ρύζι, ζυμαρικά, πατάτες), καθώς και στα φρούτα, τους χυμούς, το μέλι, τις μαρμελάδες και την επιτραπέζια ζάχαρη. Ο οργανισμός μπορεί να διασπάσει τους πεπτόμενους υδατάνθρακες αυτών των τροφίμων σε γλυκόζη, η οποία με τη σειρά της μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στον εγκέφαλο και τα υπόλοιπα όργανα για να παρέχει ενέργεια και διαθέτει αυστηρούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς για τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης στο αίμα, λειτουργία γνωστή ως ομοιοστασία της γλυκόζης.

Η γλυκόζη είναι το μόνο καύσιμο για τον ανθρώπινο εγκέφαλο, εκτός από τα διαστήματα παρατεταμένης ασιτίας, καταναλώνοντας ημερισίως 120gr γλυκόζης που αντιστοιχεί σε είσοδο ενέργειας περί τα 420 kcal περίπου, νούμερο που αγγίζει το 60% της συνολικά χρησιμοποιούμενης από το σώμα γλυκόζης. Μεταφέρεται στα κύτταρα του εγκεφάλου μέσω του μεταφορέα γλυκόζης GLUT3 σε σταθερή ποσότητα[Stryer,1997]

Στους μύες εκτός από τη γλυκόζη, ως κύρια καύσιμα χρησιμοποιούνται τα λιπαρά οξέα και τα κετονοσώματα ενώ η βασική διαφορά μυών και εγκεφάλου είναι ότι οι πρώτοι διαθέτουν μεγάλα αποθέματα γλυκογόνου, που μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη και αξιοποιείται από τους μύες[McArdle et al., 2000]

Στο λιπώδη ιστό οι αποθηκευόμενες τριακυλογλυκερόλες αποτελούν τα μεταβολικά καύσιμα. Οι τριακυλογλυκερόλες δεν προσλαμβάνονται άμεσα από τα λιπώδη κύτταρα, αλλά υδρολύονται από μια λιπάση, που διεγείρεται με διαδικασίες που έχουν ως έναυσμα την

ινσουλίνη. Η γλυκόζη είναι απαραίτητη στα λιπώδη κύτταρα για να συνθέσουν τριακυλογκυκερόλες[Stryer,1997]

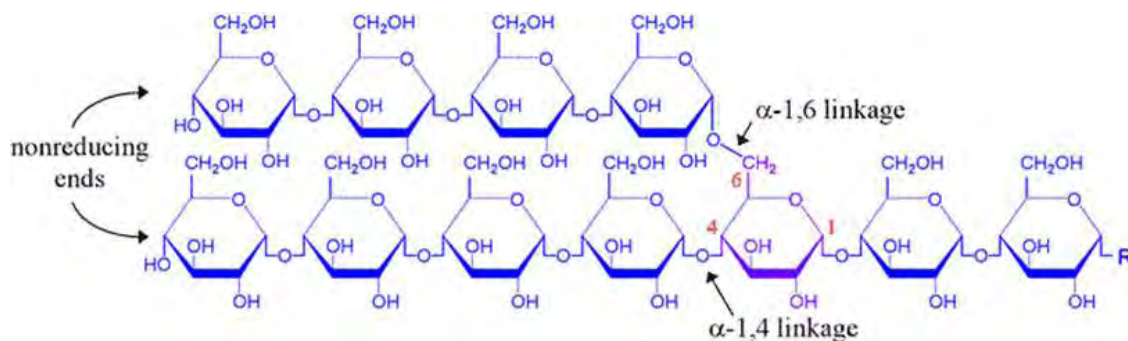
Το ήπαρ απορροφά τα 2/3 της γλυκόζης του αίματος. Η γλυκόζη που προσλαμβάνεται από το ήπαρ μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη από την εξοκινάση και την ηπατο-ειδική γλυκοκινάση. Ένα μεγάλο τμήμα της 6-φωσφορικής γλυκόζης μετατρέπεται σε γλυκογόνο. Η περίσσεια 6-φωσφορικής γλυκόζης μεταβολίζεται σε ακετυλο-CoA, που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό λιπαρών οξέων, χοληστερόλης και χολικών αλάτων. Το ήπαρ απελευθερώνει γλυκόζη στο αίμα με τη γλυκονεογένεση, δηλαδή τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γλυκόζη αλλά και τη γλυκογονόλυση, δηλαδή το μετασχηματισμό του γλυκογόνου σε γλυκόζη[McArdle et al., 2000]

2.7 Ρύθμιση της μεταφοράς της γλυκόζης

Λόγω του ότι η γλυκόζη είναι υδρόφιλη, δε μπορεί να διαχυθεί διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Οπότε η είσοδός της στους διάφορους ιστούς γίνεται με τη βοήθεια των μεταφορέων (GLUTs) που καταλύουν τη μεταφορά της γλυκόζης παρά τη χαμηλή κλίση συγκέντρωσης. Η κύρια επίδραση της ινσουλίνης στην ομοιόσταση της γλυκόζης είναι η δυνατότητά της να διεγείρει την πρόσληψη της γλυκόζης από το μυϊκό και λιπώδη ιστό. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω μετακίνησης των GLUT4 μεταφορέων της γλυκόζης από ενδοκυττάριας θέσεις, προς την κυτταρική μεμβράνη. Οι GLUT4 θεωρούνται οι σπουδαιότεροι ινσουλινοανταποκρινόμενοι μεταφορείς και εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στους σκελετικούς μυς, την καρδιά και τα ιποκύτταρα. Σε αντίθεση με τους άλλους GLUTs, που είναι κυρίως στην επιφάνεια των κυττάρων, αυτοί βρίσκονται σε ειδικά κυστίδια του κυτταροπλάσματος. Η ινσουλίνη διεγείρει την πρόσληψη της γλυκόζης μέσω της μετακίνησης αυτών των κυστιδίων προς την κυτταρική μεμβράνη, με την οποία και συγχωνεύονται, διευκολύνοντας έτσι τη δίοδο της γλυκόζης. Αυτή η διαδικασία είναι αναστρέψιμη :όταν η κυκλοφορούσα ινσουλίνη μειώνεται, οι GLUT4 μετακινούνται από τη μεμβράνη με ενδοκύττωση και επανασχηματισμό κυστιδίων.

2.8 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο ανήκει στην οικογένεια των πολυσακχαριτών και δομείται από μόρια γλυκόζης που σχηματίζουν διακλαδισμένες αλυσίδες. Οι περισσότερες μονάδες γλυκόζης στο γλυκογόνο είναι συνδεδεμένες με γλυκοζιτικούς δεσμούς α -1,4 και οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α -1,6 περίπου ανά 10 μονάδες γλυκόζης. Πρόκειται για μια άμεσα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσής του είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύς ενώ βρίσκεται στο κυτοσόλιο με τη μορφή κοκκίων.

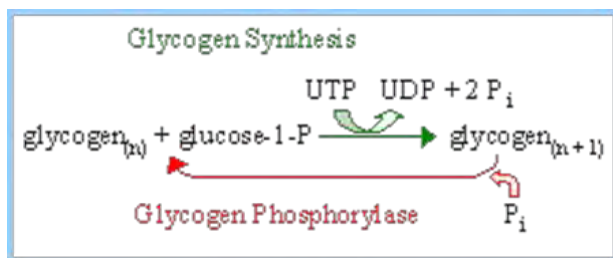


Εικόνα: Η δομή του γλυκογόνου

2.9 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Για μια αποδοτική αποικοδόμηση του γλυκογόνου απαιτούνται τέσσερις ενζυμικές δραστηριότητες, που σχετίζονται με την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, με την ανακατασκευή του ώστε να παραμείνει ένα υπόστρωμα για αποικοδόμηση και με τη μετατροπή του προϊόντος καταβολισμού του γλυκογόνου σε κατάλληλη μορφή προς περαιτέρω μεταβολισμό. Η αποδόμηση του γλυκογόνου (γλυκογονόλυση) ελέγχεται από δύο ορμόνες, τη γλυκαγόνη και την αδρεναλίνη. Και οι δύο ορμόνες επηρεάζουν τη δραστηριότητα δύο ενζύμων, της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, που συμμετέχει στη αποικοδόμηση του γλυκογόνου και ενεργοποιείται, και της συνθετάσης του γλυκογόνου, που συμμετέχει στη σύνθεση του γλυκογόνου και απενεργοποιείται.

Η αποικοδόμηση του αποθηκευμένου γλυκογόνου γίνεται μέσω της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ενός ενζύμου, που διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ορθοφωσφορικού (P_i) προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης, διαδικασία που καλείται φωσφορόλυση.



Εικόνα: Φωσφορόλυση γλυκογόνου

Υπάρχουν δύο διακριτά ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με δραστηριότητα φωσφορυλάσης γλυκογόνου. Το ένα γονίδιο (PGYL) εκφράζει την ηπατική μορφή του ενζύμου και το άλλο (PGYM) τη μυϊκή μορφή. Το γονίδιο PGYM βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11q13.1 και αποτελείται από 20 εξόνια που κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη 842 αμινοξέων. Το γονίδιο PGYL βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14q22.1 με παρόμοια δομή με το γονίδιο PGYM αλλά κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη των 845 αμινοξέων. Οι λειτουργίες και η ρύθμιση των προϊόντων των δύο αυτών γονιδίων είναι πανομοιότυπες αλλά ελλείψεις στο ένα ή το άλλο εξηγούν την ιστό-ειδική φύση πολλών εκ των ασθενειών που πηγάζουν από την αποθήκευση του γλυκογόνου.

Η δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι να αφαιρέσει τα κατάλοιπα γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου. Το προϊόν αυτής της αντίδρασης είναι η 1-φωσφορική γλυκόζη. Τα πλεονεκτήματα της αντίδρασης που προχωρά μέσω ενός φωσφορολυτικού βήματος είναι ότι η γλυκόζη που απομακρύνθηκε από το γλυκογόνο είναι σε ενεργοποιημένη κατάσταση, δηλαδή φωσφορυλιωμένη, και αυτό συμβαίνει χωρίς την υδρόλυση ATP. Παράλληλα, η συγκέντρωση του P_i στο κύτταρο είναι αρκετή για να οδηγήσει την ισορροπία της αντίδρασης στην ευνοϊκή κατεύθυνση, δεδομένου ότι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας της πρότυπης αντίδρασης είναι θετική ενώ λόγω της φωσφορολυτικής διάσπασης βεβαιώνεται πως τα κατάλοιπα γλυκόζης δεν θα διαχυθούν ελεύθερα έξω από το κύτταρο.

Η 1-φωσφορική γλυκόζη που παράγεται από τη δράση της φωσφορυλάσης μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη με το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση. Η μετατροπή της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε γλυκόζη, η οποία λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, τους νεφρούς και το έντερο, δεν συμβαίνει στους σκελετικούς μυς, αφού αυτά τα κύτταρα στερούνται το ένζυμο της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Ως εκ τούτου, οποιαδήποτε γλυκόζη που

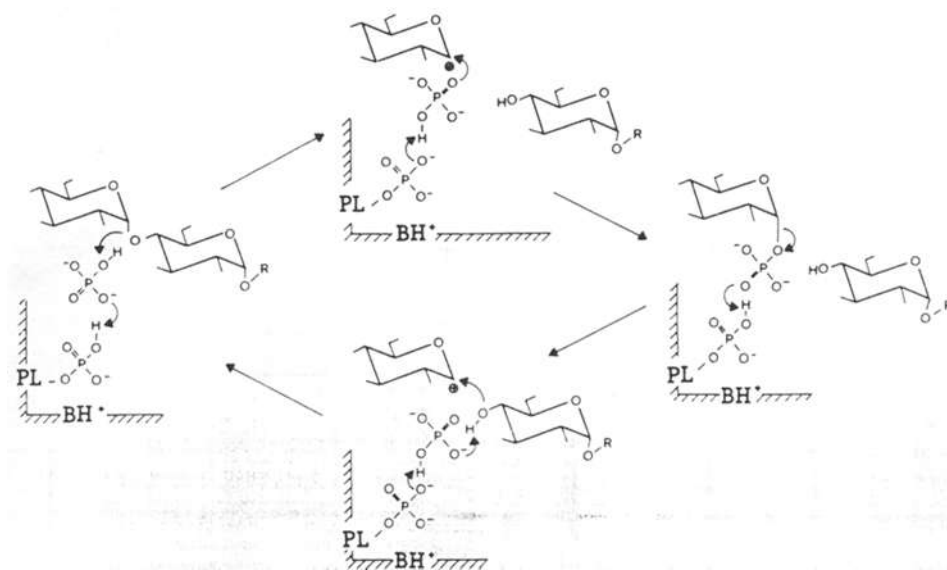
απελευθερώνεται από τις αποθήκες γλυκογόνου των μυών θα οξειδώνεται στη γλυκολυτική οδό. Στο ήπαρ, η δράση της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης επιτρέπει στη γλυκογονόλυση να παράγει ελεύθερη γλυκόζη για τη διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου δεν μπορεί να αφαιρέσει κατάλοιπα γλυκόζης από τα σημεία διακλάδωσης (α -1,6 δεσμούς) στο γλυκογόνο. Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης παύει όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο διακλάδωσης. Η απομάκρυνση των εν λόγω καταλοίπων γλυκόζης σε αυτό το σημείο διακλάδωσης απαιτεί τη δράση ενός ενζύμου αποδιακλάδωσης που χαρακτηρίζεται από 2 δραστηριότητες: γλυκοτρανσφεράσης και γλυκοζιτάσης. Η δραστηριότητα τρανσφεράσης αφαιρεί τα 3 τερματικά κατάλοιπα γλυκόζης από τον ένα κλάδο και τα προσκολλά σε ένα ελεύθερο C - 4 άκρο ενός δεύτερου κλάδου. Αυτή η μεταφορά αφήνει εκτεθειμένο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α -1,6, το οποίο απομακρύνεται από τη δράση της γλυκοζιτάσης. Αυτό το κατάλοιπο γλυκόζης είναι αφόρτιστο ,δεδομένου ότι η αντίδραση που καταλύεται από τη γλυκοζιτάση δεν είναι φωσφορολυτική. Αυτό σημαίνει ότι, θεωρητικά, η γλυκογονόλυση που συμβαίνει στους σκελετικούς μυες θα μπορούσε να δημιουργήσει ελεύθερη γλυκόζη που θα μπορούσε να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος. Όμως, η δραστηριότητα της εξοκινάσης στο μυϊκό είναι τόσο υψηλή ώστε κάθε ελεύθερη γλυκόζη να φωσφορυλιώνεται άμεσα και να εισέρχεται στη γλυκολυτική οδό. Πράγματι, ο ακριβής λόγος για την προσωρινή εμφάνιση της ελεύθερης γλυκόζης από το γλυκογόνο είναι η ανάγκη των σκελετικών μυϊκών κυττάρων να παράξουν ενέργεια από την οξείδωση της γλυκόζης, με τον τρόπο αυτό, αποκλείοντας οποιαδήποτε πιθανότητα της γλυκόζης να εισέλθει στο αίμα.

2.10 Ρόλος φωσφορικής πυριδοξάλης(PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου πρέπει να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με την εξοκονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της

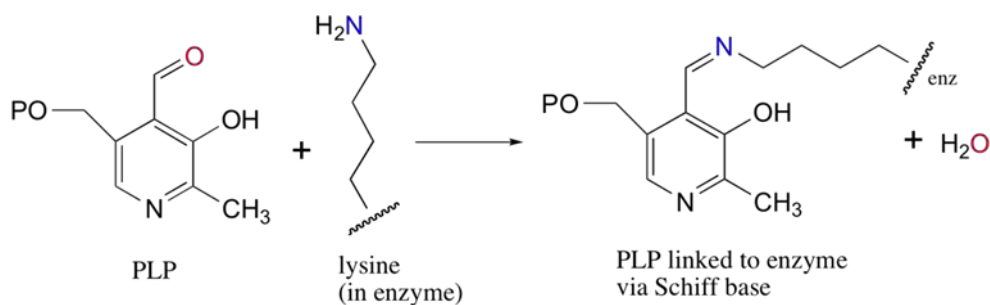
ελεύθερης γλυκόζης, για αυτό και απαιτείται αποκλεισμός του νερού από το ενεργό κέντρο [Stryer, 1997]. Το υποστρώμα του γλυκογόνου αλλά και το προϊόν 1-φωσφορική γλυκόζη έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι σημαντική για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτούνται συνήθως δύο βήματα. Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη [Stryer, 1997].



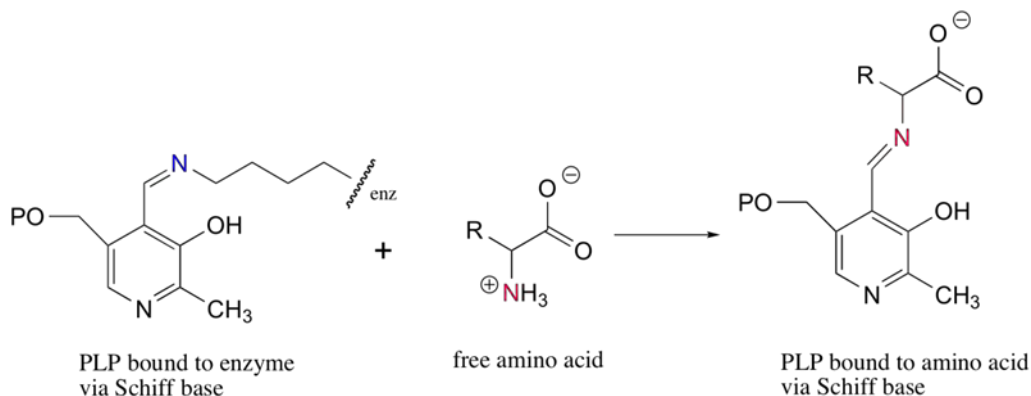
Εικόνα: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Στο πρώτο βήμα (επάνω αριστερά), τα υποστρώματα γλυκογόνου και το φωσφορικό βρίσκονται στην ενεργό κατάσταση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός διασπάται όταν τα ηλεκτρόνια από τη μία πλευρά του γλυκοσιδικού μονομερούς δωρίσουν ηλεκτρόνια προς την φωσφορική ομάδα του υποστρώματος. Αυτό αφήνει το μονομερές του γλυκογόνου υδροξυλιωμένο στο 4' OH θέση και αφήνει την 1' θέση της μονομερούς γλυκόζης με ένα θετικό φορτίο. Σε αυτό το βήμα, η PLP δίνει τη φωσφορική της ομάδα στη φωσφορική ομάδα του υποστρώματος. Στο επόμενο βήμα (επάνω στην κορυφή της εικόνας) το φωσφορικό υποστρώμα δωρίζει ηλεκτρόνια στο καρβοκατιόν στην θέση 1' του μονομερούς γλυκόζης, σχηματίζοντας 1-φωσφορική γλυκόζη και ελευθερώνοντάς τη ως προϊόν. Η ομάδα PLP παίρνει πίσω το πρωτόνιο που δώρισε στο φωσφορική ομάδα του υποστρώματος. Έτσι το στάδιο διάσπασης είναι απλά μια συντονισμένη αντίδραση δύο σταδίων. Τα επόμενα δύο βήματα στο διάγραμμα δείχνουν ουσιαστικά την αντίστροφη αντίδραση των δύο πρώτων βημάτων. Και πάλι αυτό θα συμβεί κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης του φωσφορικού, και υψηλή συγκέντρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης.

Σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό δράσης της GP παίζει και η 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) [Oikonomakos et al., 1992]. Σε κάθε καταλυτική της πλευρά, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχει μια PLP. Η GP περιέχει 1 mol 5'φωσφορικής πυριδοξάλης ανά mol ενζύμου. Η φωσφορική πυριδοξάλη αποτελεί συμπράγοντα πολλών ενζύμων στα οποία περιλαμβάνονται οι τρανσαμινάσες, οι αποκαρβοξυλάσες των α-αμινοξέων και η γλυκογονική φωσφορυλάση. Στις αντιδράσεις τρανσαμίνωσης, στις οποίες συμμετέχει η φωσφορική πυριδοξάλη, ο οργανισμός προμηθεύεται τα μη απαραίτητα αμινοξέα. Κοινός μηχανισμός σε όλες τις αντιδράσεις που συμμετέχει, είναι ο σχηματισμός ενός ενδιάμεσου προϊόντος μεταξύ του υποστρώματος του αμινοξέος και της φωσφορικής πυριδοξάλης, που ονομάζεται βάση Schiff. Όπως δείχνει η εικόνα παρακάτω, η φωσφορική πυριδοξάλη είναι συνδεδεμένη ομοιοπολικά, μέσω βάσης Schiff, με μια λυσίνη της φωσφορυλάσης.



Το επόμενο βήμα μπορεί να ονομαστεί ως μεταφορά της βάσης Schiff: η PLP μεταφέρεται από το ένζυμο της λυσίνης προς το άζωτο του υποστρώματος του αμινοξέος.



3.1 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα ένζυμο που ρυθμίζει τη χρήση της αποθηκευμένης γλυκόζης ως πηγή ενέργειας. Καταλύει το πρώτο στάδιο της ενδοκυτταρικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου στους μυς, το ήπαρ και τον εγκέφαλο. Προκειται για το πρώτο αλλοστερικό ένζυμο που ανακαλύφθηκε από την επιστημονική ομάδα των Carl και Gerty Cori. Το μονομερές ένζυμό της είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη, συντιθέμενη από 842 αμινοξέα με μάζα 97.434 kDa στα μυϊκά κύτταρα. Ενώ το ένζυμο μπορεί να υπάρχει ως ανενεργό μονομερές ή τετραμερές, είναι βιολογικά ενεργό ως διμερές με δύο πανομοιότυπες υπομονάδες.

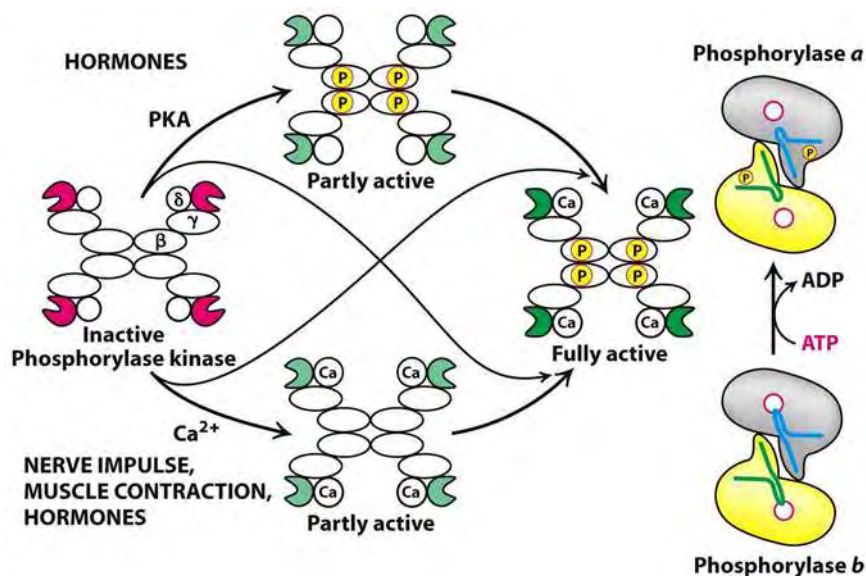
Παράγει γλυκόζη για το μεταβολισμό όταν τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα είναι χαμηλά. Υπάρχουν πολλαπλές μορφές που βρέθηκαν σε ανθρώπους, κυρίως στους μύες και το ήπαρ, και μερικές στον εγκέφαλο. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Το είδος της κάθε ισομορφής διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη σε περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας, ενώ η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης [Lehninger, 2008]. Να σημειωθεί πως από τους μύες απουσιάζει η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, οπότε όταν παράγεται η 6-φωσφορική γλυκόζη από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, μπορεί να εισέλθει στη γλυκόλυση και αυτό γιατί παρέχεται γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα διμερές αποτελούμενο από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες και έχει έναν απαραίτητο συμπαράγοντα, τη φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Η GP μπορεί να βρεθεί σε δύο διαφορετικές καταστάσεις, τη φωσφορυλάση γλυκογόνου α (GP_a) και φωσφορυλάση γλυκογόνου β (GP_b). Η διαφορά στις

δομές οφείλεται στην φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser-14, που οδηγεί στην ενεργή μορφή (GPa). Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες αποφωσφορυλιώνουν την GPa στην ανενεργό μορφή, επίσης γνωστή ως GPb. Και οι δύο μορφές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μπορούν επίσης να βρεθούν στην T και R κατάσταση, όπου T είναι η ανενεργή κατάσταση, επειδή φαίνεται να έχει μια χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα και R είναι η ενεργή κατάσταση όπου φαίνεται να έχει μια μεγαλύτερη συγγένεια για το υπόστρωμα.

Κοιτώντας τις διαφορές μεταξύ των δύο ισομορφών, στους μύες και το ήπαρ παρατηρούμε πως η GPa στο ήπαρ έχει μια ιδιότητα που δεν υπάρχει στη μυική GPa, κυρίως το ότι παρεμποδίζεται αλλοστερικά από τη συσσώρευση γλυκόζης. Η γλυκόζη που δεσμεύεται στην ηπατική GPa της οδηγεί στο να μετατραπεί στην T μορφή (ανενεργή μορφή). Αυτό δε συμβαίνει στους μύες και είναι ένα σημαντικό ρυθμιστικό βήμα στο ήπαρ, επιτρέποντάς του να 'κλείσει' όταν η γλυκόζη συσσωρεύεται πιο γρήγορα απ' ό,τι χρειάζεται. Επίσης, η GPb μορφή είναι μη ευαίσθητη στο AMP, σε αντίθεση με τη μυική GPb.

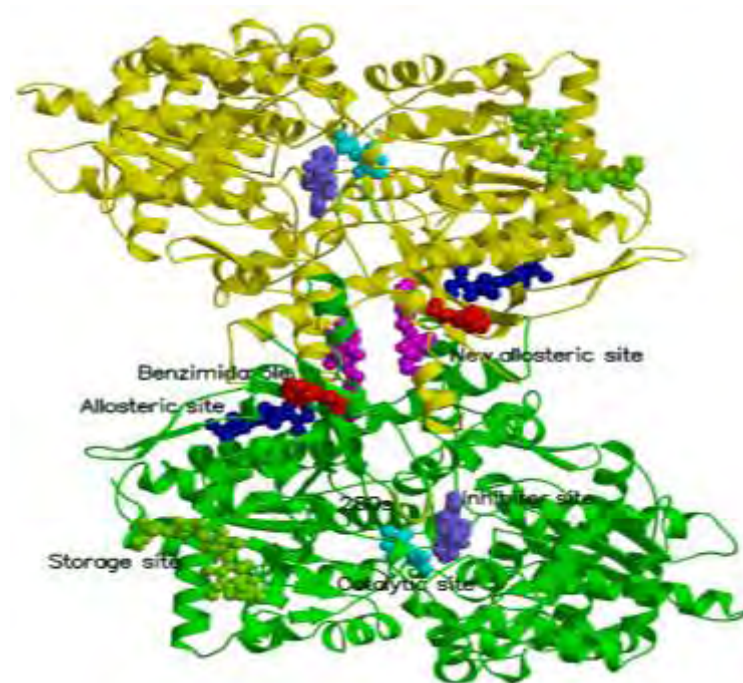
Η ομοιοπολική τροποποίηση του ενζύμου από την GPa και GPb μορφή αντίστοιχα, καταλύεται από την κινάση της φωσφορυλάσης [Stryer, 1997]. Πρόκειται για μια πολύ μεγάλη πρωτεΐνη με μάζα 1200kd και έχει υπομονάδες (αβγδ)₄. Φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου σε δύο κατάλοιπα σερίνης, προκαλώντας τη διαμορφωτική αλλαγή που ευνοεί την ενεργή GPa σε σχέση με την ανενεργή GPb. Είναι ένα ομοτετραμερές από τετραμερή που είναι τοποθετημένα σε σχήμα 'πεταλούδας'. Η γ υπομονάδα είναι η περιοχή της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου, ενώ οι άλλες τρεις εξυπηρετούν ρυθμιστικές λειτουργίες. Η κινάση της φωσφορυλάσης ενεργοποιείται από ορμονες που οδηγούν στη φωσφορυλίωση της β υπομονάδας αλλά και από τη δέσμευση Ca^{2+} στην υπομονάδα δ με επίτευξη της μέγιστης δραστηριότητας όταν συντρέχουν και οι δύο τρόποι διέγερσης. Συγκεκριμένα, μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GPa ενώ με μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G, υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στην ανενεργή μορφή GPb.



Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ρυθμίζεται τόσο από αλλοστερικό έλεγχο όσο και από τη φωσφορυλίωση. Ορμόνες όπως η επινεφρίνη, η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη ρυθμίζουν τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου χρησιμοποιώντας συστήματα ενισχύσης με δεύτερους αγγελιοφόρους που συνδέονται σε G πρωτεΐνες. Η επινεφρίνη ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση μέσω ενός επτά-διαμεμβρανικού υποδοχέα συζευγμένο με Gs οποία, με τη σειρά του, ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση για να αυξήσει τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις cAMP. Η cAMP δεσμεύει και απελευθερώνει μια δραστική μορφή της πρωτεΐνης κινάσης A (PKA). Κατόπιν, η PKA φωσφορυλιώνει την κινάση της φωσφορυλάσης, που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου b (GPb), μετατρέποντάς το στην ενεργό φωσφορυλάση του γλυκογόνου a. Αυτή η φωσφορυλίωση προστίθεται επάνω στη σερίνη 14 της GPb.

Στο ήπαρ, η γλυκαγόνη ενεργοποιεί άλλο ένα υποδοχέα συνδεδεμένο με G πρωτεΐνη που οδηγεί σε ένα διαφορετικό καταρράκτη αντιδράσεων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC). Η PLC προκαλεί έμμεσα την απελευθέρωση ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων στο κυττόςόλιο. Η αυξημένη διαθεσιμότητα του ασβεστίου συνδέεται στην υπομονάδα καλμοδουλίνης και ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η οποία κατόπιν ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Δεδομένου ότι αυτό το ένζυμο ελέγχει το πρώτο βήμα στη χρησιμοποίηση της γλυκόζης, η δράση της είναι πολύπλοκη και υπόκειται σε υψηλό ρυθμιστικό έλεγχο. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου πραγματοποιεί το πρώτο βήμα για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου για την παραγωγή ατομικών μορίων γλυκόζης. Αυτό το ένζυμο προσθέτει ένα μόριο ανόργανου φωσφορικού σε μία μονάδα γλυκόζης στο άκρο μιας αλυσίδας γλυκογόνου, μετατρέποντάς το σε 1-φωσφορική γλυκόζη και απελευθερώνοντας το από το γλυκογόνο. Η 1-φωσφορική γλυκόζη ακολούθως μετασχηματίζεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη από ένα άλλο ένζυμο και εισέρχεται στον κύκλο της γλυκόζης, καταλήγοντας να χρησιμοποιείται στην αερόβια αναπνοή.



3.2 Αλλοστερικές Αλληλεπιδράσεις

Η δραστηριότητα των πρωτεϊνών πρέπει να ρυθμίζεται ώστε να λειτουργούν στον κατάλληλο χρόνο και τόπο. Ο αλλοστερικός έλεγχος είναι ένας από τους τρόπους με τους οποίους ρυθμίζεται η βιολογική δραστηριότητα των πρωτεϊνών. Ο όρος αλλοστερικό φαινόμενο πρωτοαναφέρθηκε από τους Monod, Changeux και Jacob, για να εξηγήσει την ανταγωνιστική αναστολή των ενζύμων από ενώσεις που έχουν μικρή ομοιότητα στη δομή με το υπόστρωμα. Σαν ισοστερικός αναστολέας μπορεί να χαρακτηριστεί ο ανταγωνιστικός αναστολέας που είναι δομικό ανάλογο του υποστρώματος, ενώ σαν αλλοστερικός αναστολέας, όταν είναι διαφορετικής δομής από το υπόστρωμα. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες περιέχουν ρυθμιστικές και πολλαπλές λειτουργικές θέσεις. Συγκεκριμένα ως αλλοστερικές πρωτεΐνες ορίζονται εκείνες που διαθέτουν τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Το υπόστρωμα συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο ενώ στο αλλοστερικό, που μπορεί να είναι όχι μόνο μακριά από το ενεργό κέντρο αλλά και σε άλλη υπομονάδα, συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Αυτές οι ενώσεις δρουν ως ρυθμιστές του ενζύμου και μπορεί να αναστέλλουν ή να ενεργοποιούν το συγκεκριμένο ένζυμο. Η δημιουργία του συμπλέγματος ενζύμου - αλλοστερικού τροποποιητή δεν ενεργοποιεί κάποια χημική αντίδραση, αλλά προκαλεί μία ελαφρά τροποποίηση στη δομή του ενζύμου. Αυτή η τροποποίηση ονομάζεται αλλοστερική μετάπτωση και μεταβάλλει τη χωροδιάταξη του ενεργού κέντρου, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η βιολογική δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός τροποποιητής δε δεσμεύεται στο ίδιο κέντρο με το υπόστρωμα ούτε συμμετέχει σε χημική αντίδραση, οπότε δεν είναι απαραίτητο η δομή του να μοιάζει με τη δομή του υποστρώματος. Η πρόσδεση μικρών σηματοδοτικών μορίων σε θέσεις διαφορετικές από το ενεργό κέντρο (μη ανταγωνιστική παρεμπόδιση) οδηγεί σε αλλαγές στη στερεοδιάταξη, οι οποίες μεταβιβάζονται στο ενεργό κέντρο [McArdle et al., 2000]. Επομένως, οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι μεταγωγοί πληροφοριών με τη δραστηριότητά τους να μπορεί να τροποποιηθεί σε απόκριση σηματοδοτικών μορίων ή της πληροφορίας που μοιράζεται μεταξύ των ενεργών κέντρων [Stryer, 1997].

Υπάρχουν τέσσερα είδη αλλοστερικών αλληλεπιδράσεων, ανάλογα με το αν οι προσδέτες είναι ίδιοι ή διαφορετικοί, έχοντας έτσι ομοτροπική θετική ή αρνητική επίδραση και ετεροτροπική θετική ή αρνητική επίδραση. Τα περισσότερα αλλοστερικά ένζυμα είναι ολιγομερή, (έχουν π.χ τεταρτοταγή δομή). Η δέσμευση ενός υποκαταστάτη στο ένα

πρωτομερές των ενζύμων, μπορεί να επηρεάσει τη δέσμευση άλλων μορίων του ίδιου υποκαταστάτη, στα άλλα πρωτομερή του ενζύμου(ομότροπες αλληλεπιδράσεις). Η δέσμευση ενός υποκαταστάτη στο ένα πρωτομερές επηρεάζει τη δέσμευση διαφορετικού υποκαταστάτη στο πρωτομερές αυτό (ετερότροπη αλληλεπίδραση) (π.χ.επίδραση αναστολέα στη δέσμευση υποστρώματος). Η μεταβίβαση των ομότροπων και ετερότροπων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα πρωτομερή του ενζύμου,οφείλεται στο συνεργιστικό φαινόμενο.Όταν συμβαίνουν και τα δύο φαινόμενα (αλλοστερικοί τροποποιητές είναι και το υπόστρωμα και άλλες ενώσεις), τότε έχουμε ομοετερότροπες(μικτές) αλληλεπιδράσεις.

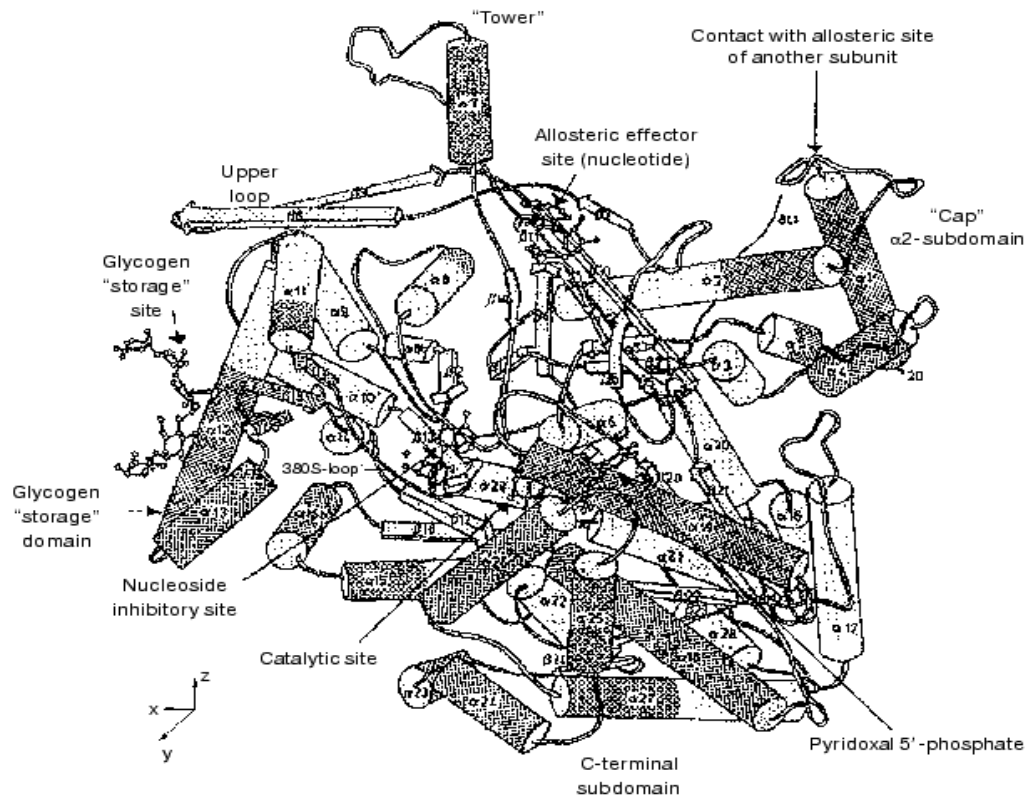
Η θεωρία του συνεργιστικού φαινομένου προτάθηκε για να εξηγήσει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στις θέσεις δέσμευσης των υποκαταστατών στις υπομονάδες (πρωτομερή) των ολιγομερών ενζύμων. Ο όρος συνεργιστικό φαινόμενο, αναφέρεται στο φαινόμενο όπου η δέσμευση ενός μορίου υποκαταστάτη σε ένα πρωτομερές του ενζύμου,επηρεάζει τη δέσμευση του δεύτερου μορίου ίδιου υποκαταστάτη σε άλλο πρωτομερές του ίδιου ενζύμου.Θετικό συνεργιστικό φαινόμενο συμβαίνει όταν στην ομότροπη αλληλεπίδραση,η δέσμευση του μορίου του υποκαταστάτη αυξάνει την ικανότητα του ενζύμου για δέσμευση των άλλων μορίων του υποκαταστάτη,ενώ αρνητικό συνεργιστικό φαινόμενο ή μη συνεργιστικό συμβαίνει όταν μειώνεται η ικανότητα του ενζύμου για δέσμευση των άλλων μορίων του υποκαταστάτη.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, με μονομερή που συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Το κάθε μονομερές βρίσκεται σε δύο διαμορφώσεις, μία συμπαγή και σχετικά ανενεργό μορφή που λέγεται τεταμένη κατάσταση T και μια εκτεταμένη μορφή που λέγεται χαλαρωμένη κατάσταση R, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά L, που είναι η αναλογία των πρωτεϊνών σε T και R κατάσταση υπό την απουσία προσδέτη. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγενειά τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η ισορροπία μεταξύ των δύο διαμορφώσεων R και T ανάλογα με τον υποκαταστάτη που είναι παρόν,οπότε εμφανίζονται ομοτροπικές και ετεροτροπικές αλληλεπιδράσεις. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται

με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, που συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα [Monod et al., 1965].

Μιλώντας για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου η μετάβαση από την κατάσταση T στην κατάσταση R συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α- έλικες, που μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή επειδή το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη [Stryer 1997].

Στο αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη που οδηγεί στη μετάβαση προς την τεταμένη T κατάσταση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την R κατάσταση και το ATP ανταγωνίζεται το AMP. Στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου συνδέεται φυσιολογικά η γλυκόζη, που οδηγεί σε αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλεί μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση [Oikonomakos 2001].



Εικόνα: Το σχήμα αναπαριστά ένα μονομερές GPb. Κάθε μονομερές αντιπροσωπεύει μια πρωτεΐνη του τύπου άλφα-βήτα με την πολυπεπτιδική αλυσίδα να διπλώνεται σε ένα μάλλον συμπαγές σφαιρίδιο με ακτίνα 3 nm, που αποτελείται από δύο ξεχωριστές περιοχές: μία αμινο-τερματική (κατάλοιπα 10 έως 484) και C-τερματικού (κατάλοιπα 485 - 842). Η καταλυτική πλευρά, που προσδιορίζονται από την πρόσδεση των υποστρωμάτων της 1-φωσφορικής γλυκόζης, του γλυκογόνου και του ανταγωνιστικού αναστολέα της γλυκόζης, βρίσκεται σε μια βαθιά σχισμή μεταξύ των δύο περιοχών στο κέντρο του μορίου. Ο συμπαράγοντας που είναι αναγκαίος για τη δραστηριότητα της GP, ο PLP, αποτελεί επίσης τμήμα της καταλυτικής πλευράς. Η ομάδα αλδεϋδης του PLP δεσμεύεται ως βάση Schiff με Lys680.

Η ανενεργός μορφή της GPb ενεργοποιείται από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και αναστέλλεται από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη, την UDP-Glc, από πουρίνες και από την D-γλυκόζη. Η ύπαρξη ανιόντων σε υψηλές συγκεντρώσεις μαζί με ορισμένους διαλύτες οργανικής φύσεως μπορούν *in vitro* να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια είναι η δράση πρωταμινών, σπερμινών, κάποιων πολυαμινών, των φθοροανιόντων αλλά και των δισθενών κατιόντων μαγνησίου και ασβεστίου [Oikonomakos et al., 1992].

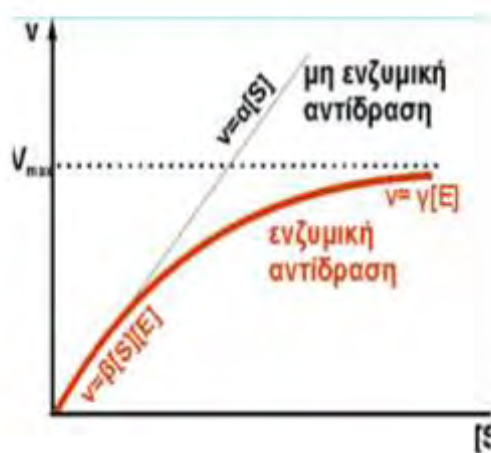
3.3 Κέντρα σύνδεσης της GP

Μέσω κρυσταλλογραφικών και βιοχημικών μελετών αποδείχθη πως η GP έχει έξι κέντρα σύνδεσης: 1) το κέντρο φωσφορυλίωσης της σερίνης Ser 14, που ευθύνεται για την ομοιοπολική μετατροπή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από την α στη β μορφή, 2) το αλλοστερικό κέντρο, στο οποίο οι ενώσεις που συνδέονται είτε ενεργοποιούν (πχ AMP, IMP, G1P) είτε αναστέλλουν (πχ ATP, ADP) τη δράση του ενζύμου, 3) το καταλυτικό κέντρο, που αρκετά κοντά του βρίσκεται η PLP. Επειδή στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη, γίνεται αυτή εφικτή από ένα στενό κανάλι πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται από το βρόγχο αμινοξικής αλληλουχίας 282-285. Μόλις το ένζυμο μεταβεί από την T στην R διαμόρφωση, εκτοπίζεται ο παραπάνω βρόγχος και επιτρέπει τη διόδο του υποστρώματος [Oikonomakos et al., 1992], 4) το αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου), απ όπου η φωσφορυλάση συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Παράλληλα, το κέντρο αυτό λειτουργεί και ως κέντρο ρύθμισης, αφού έχουμε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης με το που καταληφθεί από τον ολιγοσακχαρίτη [Oikonomakos et al., 1992], 5) το κέντρο αναστολής, που είναι ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου. Όταν βρίσκεται σε T διαμόρφωση το κέντρο αναστολής κλείνει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Με βάση μελέτες έχει δειχθεί πως πουρίνες, νουκλεοσίδια, φωσφονουκλεοτίδια αλλά και κάποια ετεροκυκλικά σωματίδια συνδέονται στο κέντρο αναστολής της μυικής GP_a και GP_b αλλά όχι της ηπατικής GP_a. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτίδια που συνδέονται στο κέντρο αναστολής δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόγχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου [Oikonomakos et al., 1992], 6) το νέο αλλοστερικό κέντρο ή αλλιώς κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων, στο οποίο συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer), η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοπυρανοζυλουργία και τα ινολο-2-καρβοξαμίδια προκαλώντας σημαντικές αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της φωσφορυλάσης.

3.4 Ενζυμική Κινητική

Η χαρακτηριστική ιδιότητα και λειτουργία των ενζύμων, είναι η κατάλυση των χημικών αντιδράσεων και η μελέτη της καταλυτικής δράσης, πρέπει να βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό της ταχύτητας της χημικής αντίδρασης που καταλύεται. Από τη μελέτη της μεταβολής της ταχύτητας, καταλήγουμε σε συμπεράσματα χρήσιμα για τη δομή και για το μηχανισμό δράσης των ενζύμων (κυρίως όταν το ένζυμο είναι υψηλής καθαρότητας). Ο ορισμός ικανοποιητικών μονάδων (Units) απαιτεί να γνωρίζουμε τις βέλτιστες συνθήκες (pH, θερμοκρασία κ.λπ) για τη δράση του ενζύμου, καθώς και την επίδραση των διαφόρων παραγόντων (αναστολείς, ενεργοποιητές κ.λπ) σ' αυτήν. Στην ενζυμική κινητική πρωταρχικό ρόλο παίζει η μελέτη της ταχύτητας (v) της ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τους διάφορους παράγοντες που επιδρούν σ' αυτήν, με επίκεντρο τη μελέτη της σχέσης μεταξύ της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης και της συγκέντρωσης του ενζύμου (E) και του υποστρώματος (S).

Η συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$, είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Σε μια πρώτης τάξης μη ενζυμική αντίδραση, η μεταβολή της ταχύτητας, καθώς αυξάνει η συγκέντρωση του υποστρώματος, είναι σταθερή και η καμπύλη $v = f(S)$ είναι ευθεία. Στις περισσότερες περιπτώσεις σε μια ενζυμική αντίδραση, το διάγραμμα της αρχικής ταχύτητας (v) συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος έχει τη μορφή καμπύλης υπερβολής.



Στις ενζυμικές αντιδράσεις ακολουθείται κινητική κορεσμού. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, η ταχύτητα εξαρτάται τόσο από τη [S] όσο και από τη [E]. Από μία τιμή [S] και μετά (όταν το E έχει κορεσθεί από το S) η ταχύτητα είναι ανεξάρτητη από τη [S] και εξαρτάται μόνο από τη [E]. Δηλαδή, σε υψηλές τιμές υποστρώματος, το ένζυμο έχει κορεσθεί από το S και η ταχύτητα έχει αποκτήσει τη μέγιστη τιμή της, τη V_{max} .

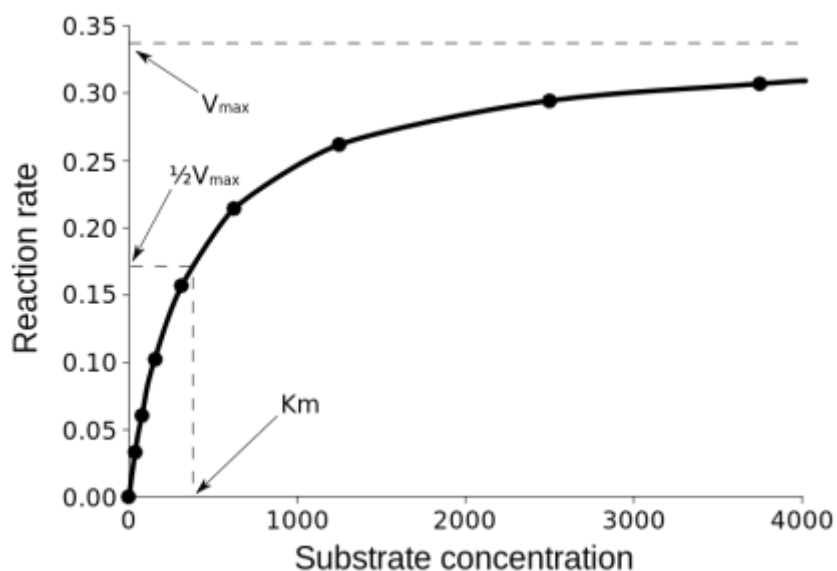
Το 1913, οι Michaelis-Menten απέδωσαν με μαθηματικό τρόπο το μηχανισμό δράσης των ενζύμων, στηριζόμενοι στην ιδέα της δημιουργίας του ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Το μοντέλο αυτό στηρίζεται στην παραδοχή ότι έχει αποκατασταθεί μια ισορροπία στο σύστημα. Οι σημαντικές παραδοχές είναι οι εξής: η αντίδραση μεταξύ του E και του S, $E + S \rightleftharpoons ES$ (1) παραμένει σε ισορροπία και οποιαδήποτε επίδραση της αντίδρασης $ES \rightarrow E + P$ (2) στην (1), θεωρείται αμελητέα. Οι συνθήκες αυτές επιτυγχάνονται όταν ο ρυθμός διάσπασης του συμπλόκου ES προς E και S είναι πολύ μεγαλύτερος από το ρυθμό διάσπασής του σε E και P (δηλαδή $k_{-1} \gg k_2$). Η συγκέντρωση του ελεύθερου S παραμένει σχεδόν αμετάβλητη κατά την αρχική περίοδο της αντίδρασης, και ισούται με τη συγκέντρωση του ολικού S, δηλαδή $[S] = [S_t]$. Όταν η [S] είναι πολύ μεγάλη σε σύγκριση με την K_s (όπου K_s είναι η σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ES), τότε η ταχύτητα έχει ορισθεί ως V_{max} και ισούται με:

$$v = V_{max}[S] / ([S] + K_s)$$

Η σταθερά διάσπασης του συμπλόκου K_s λέγεται σταθερά Michaelis-Menten (K_m) και η παραπάνω αντίδραση γράφεται:

$$v = V_{max}[S] / ([S] + K_m)$$

Η κινητική συμπεριφορά του συστήματος ποικίλει ανάλογα με την τιμή της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Σε χαμηλές τιμές συγκέντρωσης υποστρώματος, εμφανίζεται γραμμική αύξηση της ταχύτητας σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, ενώ υπό υψηλών συγκεντρώσεων υποστρώματος, η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος ενώ πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας V_{max} . Αποκτούμε λοιπόν μια εικόνα της συγγένειας του ενζύμου προς το εκάστοτε υπόστρωμα που χρησιμοποιείται (Σχήμα)

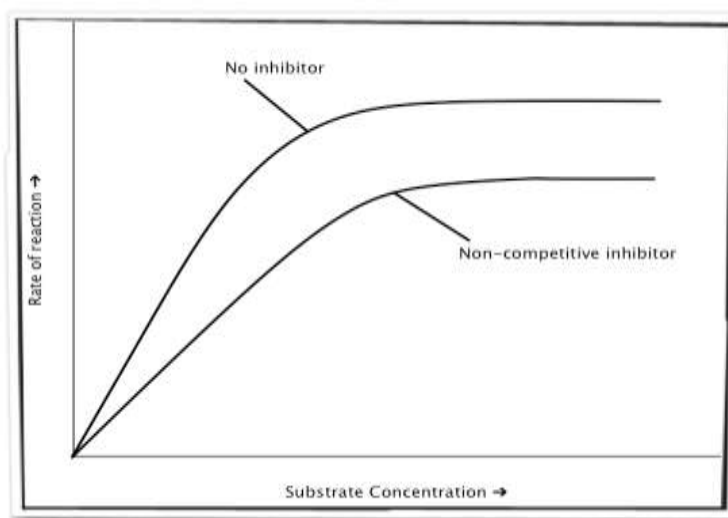


3.5 Ενζυμική Αναστολή

Η ενεργότητα πολλών ενζύμων μπορεί να μειωθεί από την πρόσδεση ειδικών μορίων ή ιόντων. Η δράση ενός αναστολέα μπορεί να είναι είτε μόνιμη (μη αντιστρεπτή) είτε αντιστρεπτή. Ως αναστολείς (inhibitors) ονομάζουμε ουσίες που, σε χαμηλή συγκέντρωση, ελαττώνουν της ταχύτητα της ενζυμικής αντιδράσεως, και μπορούν να σχηματίζουν σύμπλοκα με το ένζυμο και να παρεμποδίζουν τη δράση του. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται αργά από το ένζυμο-στόχο γιατί συνδέεται πολύ ισχυρά με αυτό, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Υπάρχουν ορισμένα σπουδαίοι μη αντιστρεπτοί αναστολείς που είναι φάρμακα, όπως η πενικιλίνη και η ασπιρίνη. Στην αντιστρεπτή αναστολή εμφανίζεται ένας ταχύς διαχωρισμός του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα.

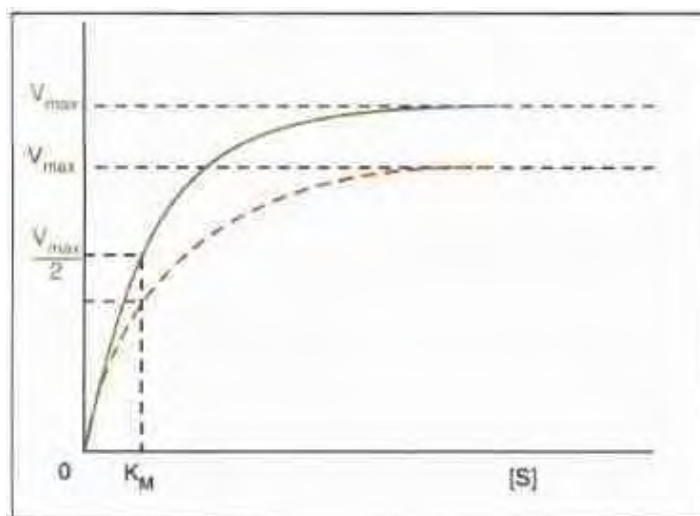
Διακρίνονται διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής, η συναγωνιστική, η ανταγωνιστική, η μικτή, η μη συναγωνιστική, η μερική, αναστολή του υποστρώματος, του προϊόντος και η αλλοστερική. Όλες διακρίνονται μεταξύ τους μέσω κινητικής μελέτης που βασίζεται στην αρχική αντίδραση. Στη συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος. Ο συναγωνιστικός αναστολέας δομικά μοιάζει με το υπόστρωμα. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που

είναι προσδεδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Η έκταση της συναγωνιστικής αναστολής εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, τη συγκέντρωση του αναστολέα και τη συγγένεια του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και τον αναστολέα. Κατά τη συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας επειδή μοιάζει με το υπόστρωμα, το συναγωνίζεται για την κατάληψη θέσεων του ενεργού κέντρου με αποτέλεσμα να αυξάνεται η K_m του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα (μειώνεται η συγγένειά τους εξαιτίας της παρέμβασης του αναστολέα).



Εικόνα: Η επάνω καμπύλη αντιστοιχεί σε αντίδραση απουσία αναστολέα ενώ η από κάτω σε αντίδραση παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα. Όπως δείχνει το σχήμα η V_{max} παραμένει αμετάβλητη ενώ η K_m του ενζύμου αυξάνεται ως προς το υπόστρωμα.

Στη μη συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας του ενζύμου προσδένεται σε περιοχή διαφορετική από το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτό οδηγεί στην τροποποίηση της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου και έτσι δε μπορεί να δεσμεύσει αποτελεσματικά το υπόστρωμα. Δεν είναι αναγκαίο ο μη συναγωνιστικός αναστολέας να έχει παρόμοια δομή με το υπόστρωμα. Η έκταση της μη συναγωνιστικής αναστολής εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αναστολέα και από τη συγγένεια του ενζύμου ως προς τον αναστολέα.



Εικόνα: Η επάνω καμπύλη αντιστοιχεί σε αντίδραση απουσία αναστολέα και η από κάτω παρουσία μη συναγωνιστικού αναστολέα. Βλέπουμε πως η K_m του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα μένει η ίδια (δε μεταβάλλεται η συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος), ενώ αλλάζει η V_{max} .

3.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Με βάση ποικίλες επιστημονικές μελέτες έχει επιβεβαιωθεί ότι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένας αξιόλογος στόχος για την εν δυνάμει κατασκευή φαρμάκων με υπογλυκαιμική δράση [Oikonomakos 2001]. Ενας από τους μοριακούς στόχους είναι η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) με δεδομένο πως το ένζυμο καταλύει το πρώτο στάδιο της ενδοκυτταρικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη. Λόγω ακριβώς του κεντρικού ρόλου της στην παραγωγή γλυκόζης στο αίμα (μέσω γλυκογονόλυσης), έχει επιλεγεί ως ενζυμικός στόχος σχεδιασμού πιθανών αναστολοέων για την παρεμπόδιση της ανεπιθύμητης γλυκογονόλυσης οπότε και για την ελάττωση της συγκέντρωσης γλυκόζης στον διαβήτη τύπου 2 [Oikonomakos, 2001].

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου βρίσκεται σε τρεις ισομορφές, τη μυική, την ηπατική και εκείνη του εγκεφάλου, και γι αυτό είναι σημαντικό οι πιθανοί αναστολείς να στοχεύουν αποκλειστικά στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζονται οι άλλες δύο ισομορφές [Somsak et al., 2008]. Η σύγχρονη προσέγγιση

προκειμένου στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, αφορά στη δημιουργία νέων προϊόντων προερχόμενων από φυσικά εκχυλίσματα (πχ εκχυλίσματα ροδιού), ώστε να βελτιωθεί σημαντικά η ποιότητα ζωής των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη και να αποφευχθεί η ιδιαίτερα επίπονη διαδικασία χορήγησης ενέσιμης ινσουλίνης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και Μέθοδοι

1.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κουνελιού

Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο των Fischer και Krebs(1962) για την απομόνωση της μυικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b μορφής εφαρμόζοντας μικρές τροποποιήσεις όπως τη χρησιμοποίηση β-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα.

Υλικά

- Κουνέλια (μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό Διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1 σε pH 6,8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃)
- Διάλυμα οξικού οξέος CH₃COOH 1N, MB=60,05
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (υδροξυμέθυλο)-αμινομεθένιο, pH 7,5
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%, 3.6M
- Διάλυμα Tris 2.0M (αρύθμιστου pH)
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH 7.0)

- C₃H₈O₃-Γλυκερόλη 100%
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH 7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂ Mg 1.0M
- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης (που έχουν επεξεργαστεί με 1% NaCO₃ και 10mM EDTA στους 100°C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 20% αιθανόλη στους 4°C)

Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παραπάνω διαδικασία

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Αναλυτικός Ζυγός
- Χρονόμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Συσκευή Vortex
- Χειροκίνητη κρεατομηχανή
- Αντλία κενού Buchner

Περιγραφή Διαδικασίας

1^ο Βήμα: Παραλαβή ιστού και εκχύλιση του ενζύμου εξ αυτού

Στην αρχή, αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς των κουνελιών, αλέθονται με χειροκίνητη κρεατομηχανή και ζυγίζονται. Ο συλλεγόμενος κιμάς εκζυλίζεται με 3 φορές με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες γίνονται χρησιμοποιώντας όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών των κουνελιών και η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα **30 λεπτά**. Το περισυλλεγόμενο εκχύλισμα

φιλτράρεται μέσω ναλοβάμβακα προκειμένου να απομακρυνθούν οι λιπαρές ουσίες και τα αιωρούμενα σωματίδια.

2^ο Βήμα: Όξινη καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Προσθέτουμε διάλυμα CH_3COOH 1N για ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 5,1-5,2 υπό ελαφρά ανάδευση. Αφήνουμε το εκχύλισμα για 5 λεπτά στον πάγο και με το πέρασμα του χρόνου παρατηρούμε πως η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται λόγω κατακρήμνισης των πρωτεϊνών. Κατόπιν, χρησιμοποιείται φυγόκεντρος ρυθμιζόμενη στις 5000rpm για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 0-4°C, για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολλείματα του αιωρούμενου υλικού. Μετά ρυθμίζουμε το pH στο 6.8 με κορεσμένο KHCO_3 και προχωρούμε στην ογκομέτρηση του διαλύματος.

3^ο Βήμα: Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο (90%)

Προχωρούμε σε καταβύθιση χρησιμοποιώντας θειικό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειικού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για περίπου 16 ώρες. Κατόπιν, το υπερκείμενο αποχύνεται κάνοντας χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρωση στις 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν, εφαρμόζουμε διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M σε pH 7.5 για περίπου 16 ώρες.

4^ο Βήμα: Θερμική Κατεργασία υπό υψηλό pH

Συλλέγουμε προσεκτικά το διάλυμα από τα σακουλάκια διαπίδυσης και γίνεται διαύγαση αυτού με φυγοκέντρωση στις 5500rpm για 30min στους 0-4°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH 7.0 όγκου ίσο με το 3/27 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH 7.0 ίσο με το 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8.8. Αφού επωαστεί το μείγμα στους 37°C για μια

ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψυχεί σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH_3COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και ογκομετρούμε το υπερκείμενο (ενζυμικό διάλυμα). Προστίθεται το EDTA και η μερκαπτοαιθανόλη για να προστατευτεί η πρωτεΐνη από μετουσίωση.

5^ο Βήμα: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Εν συνεχεία προσθέτουμε 1ml AMP 0.1M (pH 7.0) και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος για την υλοποίηση κρυστάλλωσης, εντός των σωλήνων φυγοκέντρωσης, (το AMP και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Αφήνεται σε ηρεμία το μείγμα στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Μετά, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης (β -GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8). Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για να απομακρυνθούν τα διάφορα συσσωματώματα. Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

6^ο Βήμα: Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της GPb μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C σε ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Χρησιμοποιούμε φωτόμετρο για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση του ενζύμου σε μήκος κύματος 280 nm. Ο μαθηματικός τύπος για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου είναι:

$$\text{C}_{\text{ενζύμου}} = \text{OD}_{280} / 1,32$$

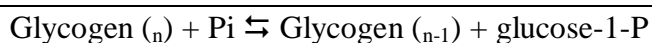
Κατόπιν προσθέτουμε ίσο όγκο γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

1.2 Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Προσδιορισμός της ειδικής δραστηρότητας του ενζύμου

Η ειδική δραστηρότητα(specific activity) αναφέρεται στη δραστηρότητα ενός ενζύμου ανά mg ολικής πρωτεΐνης(που εκφράζεται σε $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$). Δίνει μια μέτρηση της καθαρότητας του ενζύμου στο μίγμα και αναφέρεται στην ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται από ένα ένζυμο σε ένα δεδομένο χρονικό διάστημα υπό δεδομένες συνθήκες ανά χιλιοστογραμμάριο των συνολικών πρωτεϊνών. Η ειδική δραστηρότητα είναι ένα μέτρο της επεργασιμότητας του ενζύμου,σε μία συγκεκριμένη συγκέντρωση υποστρώματος, και είναι συνήθως σταθερή για ένα καθαρό ένζυμο.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου Glycogen(n), προς Glycogen (n-1) και την απελευθέρωση 1-φωσφορικής-γλυκόζης (glucose-1-P).



Στο παρόν πείραμα διεξάγεται η **αντίστροφη αντίδραση**. Υπό την παρουσία του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (Pi) που φωτομετρούνται προκειμένου να γίνει η μέτρησή τους.

Πορεία:

Γίνεται αραίωση από ένα δείγμα μικρής ποσότητας(10μL) από το ενζυμικό παρασκεύασμα με 1mL ρυθμιστικού διαλύματος 50mM β-γλυκερινοφωσφορικού νατρίου

50mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA σε pH 6,8. Το διάλυμα φωτομετρείται στα 280 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου, με χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm.

Στη συνέχεια, σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα, που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 1% (w/v), ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου και νερό.

Επίσης, σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D-Glc-1-P με προσθήκη 200μL υποστρώματος α-D- Glc -1-P (9.0-90 mM), 18μL AMP 50mM και 502μL H₂O.

Στη συνέχεια, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C για 15 λεπτά. Μετά την επώαση, προστίθενται 180μL από το ενζυμικό μείγμα στον σωλήνα του υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες: 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου β-GP 2,5 mM, β-Merc 2,5 mM, EDTA 0,05mM, υποστρώματα α-D-Glc-1-P από 2 mM έως 20 mM, η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH 6.8.

Ανά τακτά και καθορισμένα χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού), λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1%. Το SDS, είναι απορρυπαντικό και προκαλεί την αποδιάταξη και την αδρανοποίηση του ενζύμου.

Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης:

Ρυθμιστικό Διάλυμα 1: Ιμιδαζόλιο 200mM, KCl 400mM, DTT 4mM, EDTA 4mM σε pH 6,8.

Ρυθμιστικό Διάλυμα 2: Ιμιδαζόλιο 135mM, KCl 270mM, DTT 2,7mM, EDTA 2,7mM σε pH 6,8(με αραίωση του ρυθμιστικού διαλύματος 1).

Αφού παρασκευαστούν τα ρυθμιστικά διαλύματα φυλάσσονται στους 4°C.

Κατόπιν παρασκευάζεται η συγκέντρωση της G-1-P 90mM χρησιμοποιώντας 225 μ L από το πυκνό διάλυμα της G-I-P[400], 675 μ L ρυθμιστικό διάλυμα 1 και 100 μ L H₂O. Για την παρασκευή των υπολοίπων συγκεντρώσεων της G1P, δηλαδή 9mM, 18mM, 27mM και 45mM χρησιμοποιούμε αντίστοιχα:

9mM: 100 μ L G1P[90] και 900 μ L ρυθμιστικό διάλυμα 2

18mM: 200 μ L G1P[90] και 800 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 2

27mM: 300 μ L G1P[90] και 700 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 2

45mM: 500 μ L G1P[90] και 500 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 2

Αφού παρασκευαστούν τα παραπάνω διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C για να αποφευχθεί η υδρόλυση της Glc-1-P.

2.1 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis–Menten αναφέρεται στη συγκέντρωση του υποστρώματος, όπου ο ρυθμός της αντίδρασης είναι ο μισός από τη μέγιστη ταχύτητα V_{\max} . Αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου για το υπόστρωμα. Για να προσδιορισθεί η K_m του ενζύμου, θα πρέπει να γίνει η κινητική του μελέτη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α -D- Glc-1-P

Πορεία:

Γίνεται αραίωση από ένα δείγμα μικρής ποσότητας (10 μ L) από το ενζυμικό παρασκεύασμα με 1mL ρυθμιστικού διαλύματος 50mM β -γλυκερινοφωσφορικού νατρίου

50mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA σε pH 6,8. Το διάλυμα φωτομετρείται στα 280 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου, με χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm.

Στη συνέχεια, σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα, που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 1% (w/v), ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου και νερό.

Επίσης, σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται όλα τα διαλύματα υποστρώματων α-D-Glc-1-P με προσθήκη 200μL υποστρώματος α-D- Glc -1-P (9.0-90 mM), 18μL AMP 50mM και 502μL H₂O.

Στη συνέχεια, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C για 15 λεπτά. Μετά την επώαση, προστίθενται 180μL από το ενζυμικό μείγμα στον σωλήνα του υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες: 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου β-GP 2,5 mM, β-Merc 2,5 mM, EDTA 0,05mM, υποστρώματα α-D-Glc-1-P από 2 mM έως 20 mM, η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH 6.8.

Κάθε ένα λεπτό (χρόνοι 1', 2', 3', 4') λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1%. Το SDS, είναι απορρυπαντικό και προκαλεί την αποδιάταξη και την αδρανοποίηση του ενζύμου.

Αφού ληφθούν τα δείγματα προστίθεται 2,5mL διαλύματος ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία ¼ ανά δοκιμαστικό σωλήνα. Έπεται επώαση για 15 λεπτά στους 30°C και κατόπιν φωτομέτρηση αυτών στα 850nm. Από τη φωτομέτρηση υπολογίζουμε τα Pi που έχουν απελευθερωθεί και αφού επεξεργαστούμε τα δεδομένα με το υπολογιστικό πρόγραμμα Grafit προκύπτει η τιμή της K_m.

Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

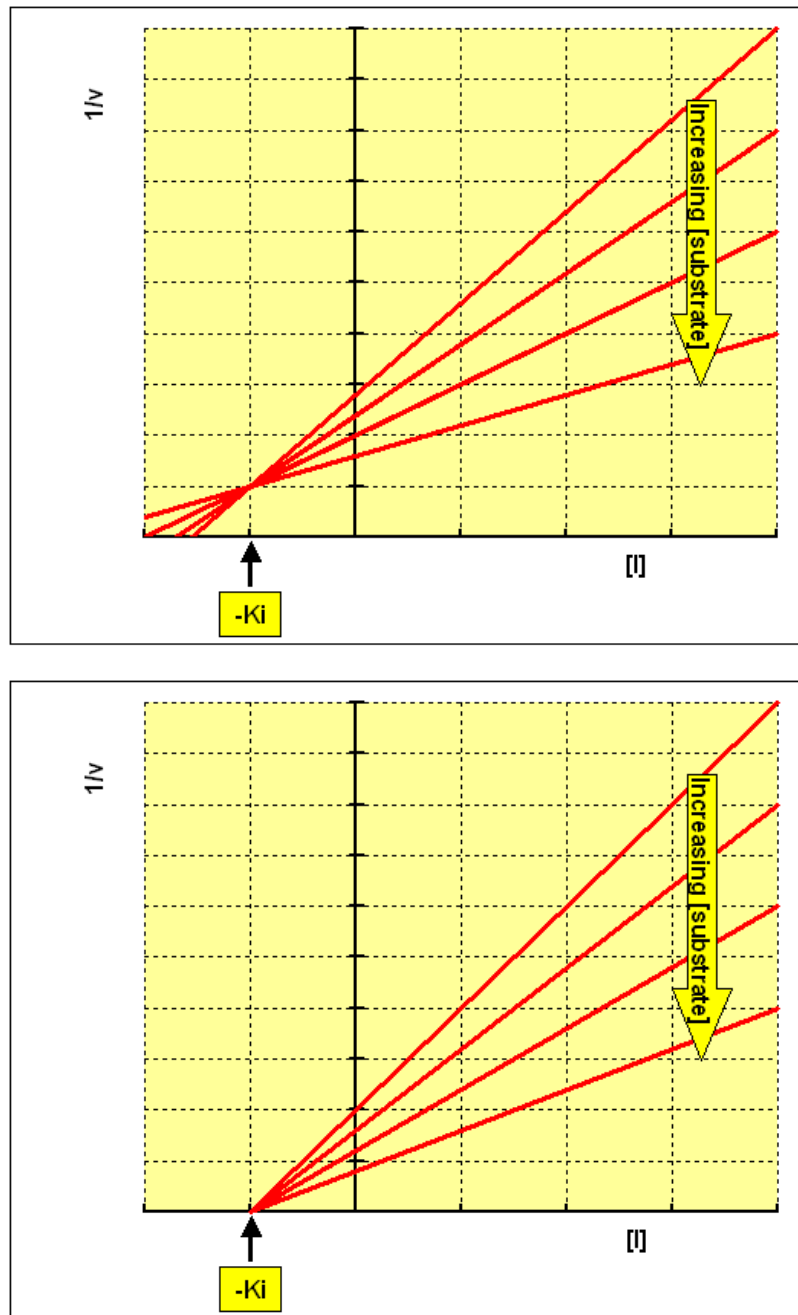
- Υδατόλουτρο

- Φασματοφωτόμετρο
- Ζυγός
- Vortex
- Πιπέτες των 20, 200 και 1000μL αντίστοιχα
- Ηλεκτρονικό Πεχάμετρο
- Χρονόμετρο
- Δοκιμαστικοί Σωλήνες

2.2 Προσδιορισμός K_i

Η σταθερά αναστολής ή σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα (K_i) αποτελεί μια ένδειξη για το πόσο ισχυρός είναι ένας συγκεκριμένος αναστολέας. Είναι η συγκέντρωση που απαιτείται για να παραχθεί το μισό της μέγιστης δυνατής αναστολής. Είναι ιδιαίτερα σημαντική για να μπορούμε να προβλέψουμε κλινικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων. Συμπεραίνουμε πως όσο μικρότερη είναι η K_i , τόσο μικρότερη ποσότητα φαρμάκου απαιτείται για να αναστείλλει τη δράση του εκάστοτε ενζύμου. Εάν η K_i είναι πολύ μεγαλύτερη από τις μέγιστες συγκεντρώσεις φαρμάκου στο πλάσμα στις οποίες ένας ασθενής εκτίθεται σε σχέση με την τυπική δοσολογία, τότε το φάρμακο δεν είναι ιδιαίτερα πιθανό να αναστείλλει την ενεργότητα του ενζύμου. Η K_i ισούται με $[E][I] / [EI]$. Στη συναγωνιστική αναστολή η K_i είναι πολύ μεγαλύτερη από τη συνολική συγκέντρωση αναστολέα και το σύμπλοκο ESI δε σχηματίζεται, όταν τόσο ο αναστολέας όσο και το υπόστρωμα ανταγωνίζονται για πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η αναστολή είναι πιο εμφανής σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος αλλά μπορεί να υπερνικηθεί σε ικανοποιητικά υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, καθώς η V_{max} παραμένει ανεπηρέαστη. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η K_i είναι πολύ μεγαλύτερη από τη συνολική συγκέντρωση υποστρώματος και το σύμπλοκο EI δε σχηματίζεται όταν ο αναστολέας σε μία θέση η οποία γίνεται διαθέσιμη μόνο μετά αφού το υπόστρωμα S_1 έχει προσδεθεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η αναστολή είναι πιο εμφανής σε υψηλές συγκεντρώσεις και δε μπορεί να υπερνικηθεί καθώς τόσο η V_{max} όσο και η K_m μειώνονται εξίσου. Στα παρακάτω σχήματα φαίνεται η δράση αναστολέα σε μία αντίδραση και η

συμπεριφορά της K_i ανάλογα με το είδος της αναστολής. Στο πρώτο σχήμα παρατηρούμε έναν συναγωνιστικό αναστολέα, ενώ στο δεύτερο ένα μη συναγωνιστικό.



Η ύπαρξη αναστολέα στην αντίδραση αναστέλει τη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης οδηγώντας στη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των P_i .

Γνωρίζουμε πως οι αναστολές στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου δρουν με βάση τη συναγωνιστική αναστολή με δεδομένο πως η πρόσδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει την οποιαδήποτε πρόσδεση του υποστρώματος.

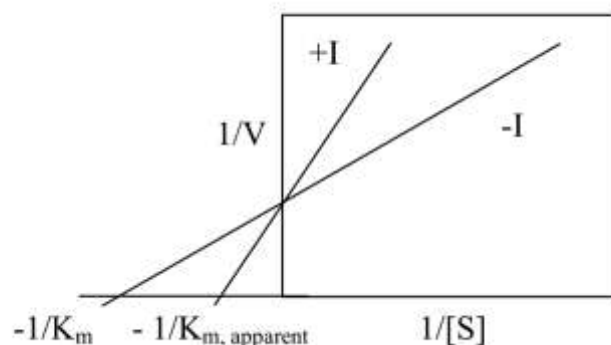
2.3 Υπολογισμός της φαινόμενης K_{map} ($K_{m,app}$) και της K_i

Κατά τη συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας, επειδή μοιάζει με το υπόστρωμα, το συναγωνίζεται για την κατάληψη θέσεων του ενεργού κέντρου με αποτέλεσμα να αυξάνεται η K_m του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Η V_{max} παραμένει αμετάβλητη αφού η παρουσία αναστολέα μπορεί να υπερνικηθεί από υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος, ενώ η φαινόμενη συγγένεια του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο μειώνεται, οπότε η σταθερά διάστασης μειώνεται. Η φαινόμενη K_m αυξάνεται και δίνεται από τον τύπο:

$$K_{mapp} = K_m (1 + [I]/K_i)$$

- Καθώς η $[I]$ αυξάνεται, η $K_{m, apparent} = K_m (1 + [I]/K_i)$ αυξάνεται. Όταν η $[I]=K_i$, ισχύει ότι: $K_{m, apparent} = 2 \times K_m$ (μειωμένη συγγένεια για το υπόστρωμα)
- Καθώς η $[S]$ αυξάνεται, ισχύει ότι: $[S] \gg K_m (1 + [I]/K_i)$, και $V \rightarrow V_{max}$

Για το σχηματισμό λοιπόν του διαγράμματος Lineweaver-Burk, που χρησιμοποιείται για την αναπαράσταση εξισώσεων ενζυμικής κινητικής, αντικαθιστούμε την K_m με $K_m (1 + [I]/K_i)$ και $1/V = \{K_m (1 + [I]/K_i)/V_{max}\}(1/[S]) + 1/V_{max}$. Καθώς η $[I]$ αυξάνεται, παρατηρούμε στο σχήμα πως η κλίση αυξάνεται αλλά το σημείο τομής στον Y άξονα παραμένει το ίδιο.



Δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση ο αναστολέας και το υπόστρωμα να προσδένονται στο ίδιο κέντρο του ενζύμου. Μιλάμε για συναγωνιστική αναστολή και ο αναστολέας μπορεί να προσδένεται σε ένα δευτερεύον κέντρο του ενζύμου επιφέροντας σημαντικές δομικές αλλαγές που να εμποδίσουν την πρόσδεση του υποστρώματος.

Πορεία

Για να υπολογιστεί η K_i πραγματοποιούνται συνολικά 5 πειράματα χρησιμοποιώντας διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα κάθε φορά. Σε κάθε μεμονωμένο πείραμα, για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής, χρησιμοποιήθηκαν 5 δοκιμαστικοί σωλήνες, ο καθένας με διαφορετική συγκέντρωση α-D-Glc-1-P κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση του αναστολέα και του AMP.

Το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή του ενζυμικού μείγματος όπως περιγράφηκε πιο πάνω και η τοποθέτησή του σε υδατόλουτρο για τουλάχιστον 15 λεπτά. Εν συνεχεία παρασκευάζονται τα 5 διαλύματα των υποστρωμάτων, με κάθε διάλυμα υποστρώματος να πρέπει να έχει τελικό όγκο 720μL, και τοποθετούνται επίσης στο υδατόλουτρο για να αποκτήσουν όμοια θερμοκρασία με το ενζυμικό μείγμα. Παρακάτω απεικονίζονται τα διαλύματα των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα. Σε κάθε ένα πείραμα, διατηρούμε σταθερή την ποσότητα των G1P κάθε διαφορετικής συγκέντρωσης (200μL), το AMP (18μL) και ανάλογα με την ποσότητα του αναστολέα που

χρησιμοποιούμε, αφαιρούμε το σύνολο όλων των συστατικών από τον τελικό όγκο 720μL για να υπολογιστεί ο όγκος του νερού.

	Σωλήνας 1	Σωλήνας 2	Σωλήνας 3	Σωλήνας 4	Σωλήνας 5
α-D-Glc-1-P	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
	2μM	4μM	6μM	10μM	20μM
AMP 50mM	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL
Αναστολέας	X μL	X μL	X μL	X μL	X μL
Νερό	720-(218+x) μL	720-(218+x) μL	720-(218+x) μL	720-(218+x) μL	720-(218+x) μL
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL	720 μL	720 μL	720 μL

Αφού αφαιθούν για επώαση το ενζυμικό διάλυμα για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο (30⁰C) αλλά και τα υποστρώματα (μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία παρόμοια με το ενζυμικό μείγμα), μεταφέρονται 180μL ενζυμικού διαλύματος σε κάθε διάλυμα υποστρώματος προκειμένου να ξεκινήσει η αντίδραση. Κατόπιν, ανά λεπτό, λαμβάνονται 200μL από το διάλυμα της αντίδρασης και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, που ο καθένας περιέχει 50μL 1% SDS και η αντίδραση σταματά λόγω του ότι το SDS έχει απενεργοποιεί και αποδιατάσσει το ένζυμο. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις α-D-Glc-1-P .

Σε κάθε δείγμα προστίθεται 2,5mL από το διάλυμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 και στη συνέχεια επωάζονται για 15 λεπτά στους 30⁰C. Για τη μέτρηση των αποτελεσμάτων κάνουμε φωτομέτρηση στα 850nm, από την οποία υπολογίζεται ο αριθμός των φωσφορικών που απελευθερώνονται από κάθε αντίδραση. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα που χρησιμοποιήθηκαν, έτσι ώστε να παρθεί ικανοποιητικός αριθμός δεδομένων για τον τελικό υπολογισμό της Ki. Τέλος, χρησιμοποιείται το υπολογιστικό πρόγραμμα Grafit όπου επεξεργάζονται τα δεδομένα και προκύπτει η τιμή της Ki.

2.4 Παρασκευή τυφλών

Είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb και γι αυτό επιβάλλεται η διόρθωση των απορροφήσεων λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων που δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Συντίθενται τα εξής τυφλά:

- Τυφλό νερού προκειμένου να μηδενιστεί κατάλληλα το φωτόμετρο
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α-D-Glc-1-P που χρησιμοποιείται, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της.
- Τυφλό γλυκογόνου (προερχόμενο από το ενζυμικό διάλυμα) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών ιόντων
- Τυφλό πρότυπο διάλυμα φωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$.

Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός από το νερό, και υπολογίζουμε το μέσο όρο των απορροφήσεων τους. Στην περίπτωση δε των φωσφορικών, υπολογίζουμε το μέσο όρο των δύο προκύπτόμενων τυφλών και το διαιρούμε με το 0,05.

2.5 Προσδιορισμός φωσφόρου

Τα διαλυμένα ορθοφωσφορικά, σε όξινο περιβάλλον, αντιδρούν με το μολυβδαινικό αμμώνιο σχηματίζοντας φωσφορομολυβδαινικό σύμπλοκο:



Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών επιτυγχάνεται μέσω σχηματισμού ετεροπολυοξέων ή αλάτων τους. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών κατά το σχηματισμό του γλυκογόνου, συμβάλλει σημαντικά στην κινητική μελέτη του ενζύμου.

2.6 Μέθοδος ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου

Στην μέθοδο ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού προυσία ήπιου όξινου περιβάλλοντος, το ορθοφωσφορικό αντιδρά με το μολυβδαινικό και σχηματίζει φωσφομολυβδαινικό οξύ, το οποίο μειώνεται από το ασκορβικό οξύ για να σχηματιστεί ένα μπλε σύμπλοκο. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με την παρουσία του υπάρχοντος φωσφόρου, έτσι ώστε να μπορέσει να αποφασιστεί η συγκέντρωση. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 850nm. Πρέπει η περιεκτικότητα σε φωσφορικά του κάθε δείγματος να κυμαίνεται από 0.05-0,4μM για να υπάρχει γραμμική απορρόφηση με το φωτόμετρο.

Υλικά που χρησιμοποιούνται

- Διάλυμα μολυβδαινίου και ρύθμιση σε τελικό pH 5.0. Λόγω του ότι μιλάμε για ένα φωτοευαίσθητο διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γιάλυνο δοχείο. Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με HCl 10N.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v) και ρύθμιση σε τελικό pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται προσθέτοντας σταδιακά NaOH 10N.

Αναμειγνύουμε σε αναλογία 4:1 όγκου αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος. Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και αφήνεται για επώαση τουλάχιστον 15 λεπτά. Κατόπιν αυτού του χρόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί αλλά όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs)

2.7 Μέθοδος επεξεργασίας με το Grafit

Οι απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται με βάση δείγματα αναφοράς για το γλυκογόνο και τις G1P και μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη

καμπύλη φωσφορικών. Κατόπιν προσδιορίζεται η ειδική δραστικότητα του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$V_0 = V_{\max} \left(\frac{[\text{Substrate}]}{[\text{Substrate}] + K_m} \right)$$

όπου, V : ταχύτητα

V_{\max} : μέγιστη ταχύτητα

K_m : σταθερά Michaelis-Menten

$[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος

Κατόπιν, γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$ και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{\max} .

3.1 Σκοπός της εργασίας

Η σύγχρονη φαρμακολογική αντι-διαβητική θεραπεία στοχεύει στην αυστηρή ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης του αίματος για την πρόληψη των επώδυνων αλλά και ιδιαίτερα επικίνδυνων επιπλοκών του διαβήτη τύπου 2. Ωστόσο, επειδή τα ήδη υπάρχοντα αντιδιαβητικά φάρμακα χορηγούμενα εκ στόματος συχνά αποτυγχάνουν, πολλοί ασθενείς χρειάζονται καθημερινά ενέσεις ινσουλίνης για τον έλεγχο του μεταβολισμού της γλυκόζης

και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Ήδη τα τελευταία χρόνια έλαβαν χώρα πολλές έρευνες, επί των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη μεταφορά της γλυκόζης στους σκελετικούς μυς, που προσδιόρισαν την ύπαρξη πιθανών στόχων για παρασκευή αντιδιαβητικών φαρμάκων.

Το ήπαρ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόζης και την ομοιόσταση. Αντιπροσωπεύει περίπου το 90% της ενδογενούς παραγωγής γλυκόζης του σώματος. Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, η υπερβολική παραγωγή ηπατικής γλυκόζης, μαζί με την αντίσταση στην ινσουλίνη, μπορούν να συμβάλλουν στην υπεργλυκαιμία. Η ηπατική παραγωγή γλυκόζης έχει δρα μέσω 2 κύριων βιοχημικών μονοπατιών-της γλυκογονόλυσης και της γλυκονεογένεσης. Συνεπώς, η αναστολή της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης έχει γίνει το επίκεντρο των νεότερων αντιδιαβητικών παραγόντων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Παράλληλα, η φωσφορυλάση και η γλυκοκινάση αποτελούν δύο ένζυμα που φαίνεται να έχουν κατά κύριο λόγο τον έλεγχο της ρύθμισης της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τα ηπατικά κύτταρα [Stryer, 1997].

Η συγκεκριμένη διατριβή είναι ένα τμήμα της ευρύτερης προσπάθειας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για έρευνα με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ενζύμο και το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Οι ερευνητικές προσπάθειες λοιπόν στοχεύουν στην ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη συγγένεια για την πρωτεΐνη-στόχο.

Στην παρούσα εργασία έγινε κινητική μελέτη για τον προσδιορισμό της K_i ενός χημικά συντιθέμενου αναστολέα (KD030) έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης b προερχόμενη από σκελετικούς μύες κουνελιών.

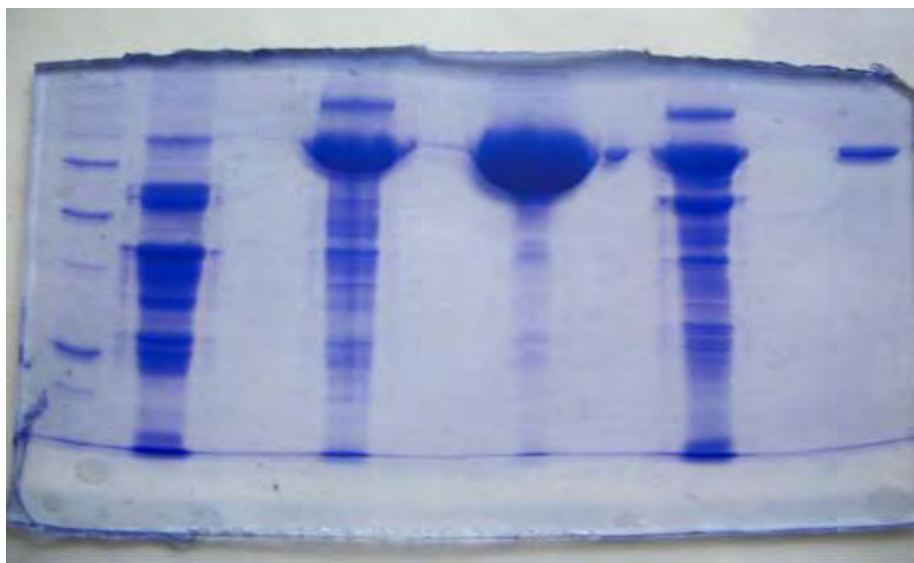
Ο πρωταρχικός στόχος είναι η ηπατική GP. Ωστόσο, το κρυσταλλογραφικό πρότυπο στο οποίο στηρίζεται ο σχεδιασμός ενώσεων στην παρούσα διατριβή είναι η μυϊκή GP. Η ηπατική GP είναι 80% ομόλογη (σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας) με τη μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

4. Αποτελέσματα

4.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Χρησιμοποιώντας την παραπάνω προαναφερθείσα διαδικασία απομονώθηκε το ένζυμο της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου(GPb) από σκελετικούς μύες κουνελιών.

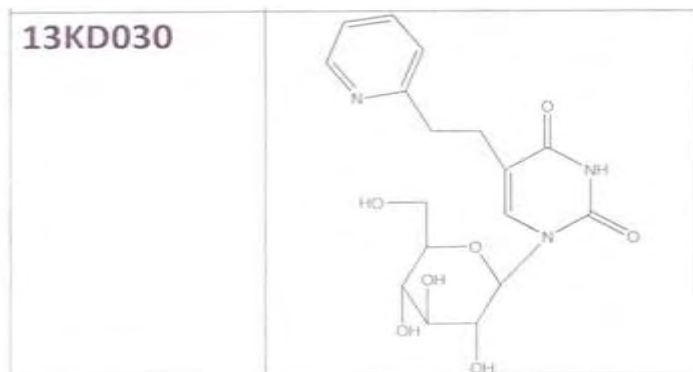
Μάρτυρας Διαδρομή 1 Διαδρομή 2 Διαδρομή 3 Διαδρομή 4 Διαδρομή 5



Εικόνα: Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά βλέπουμε το μάρτυρα ενώ στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή βλέπουμε το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH και τέλος, στην πέμπτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το πέρας της διαδικασίας, με την απομόνωση της πρωτεΐνης.

4.2 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

Κατά την υλοποίηση της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η δράση της χημικά συντιθέμενης ουσίας KD030. Η σύνθεση έγινε στο Εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Η δομή του φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:

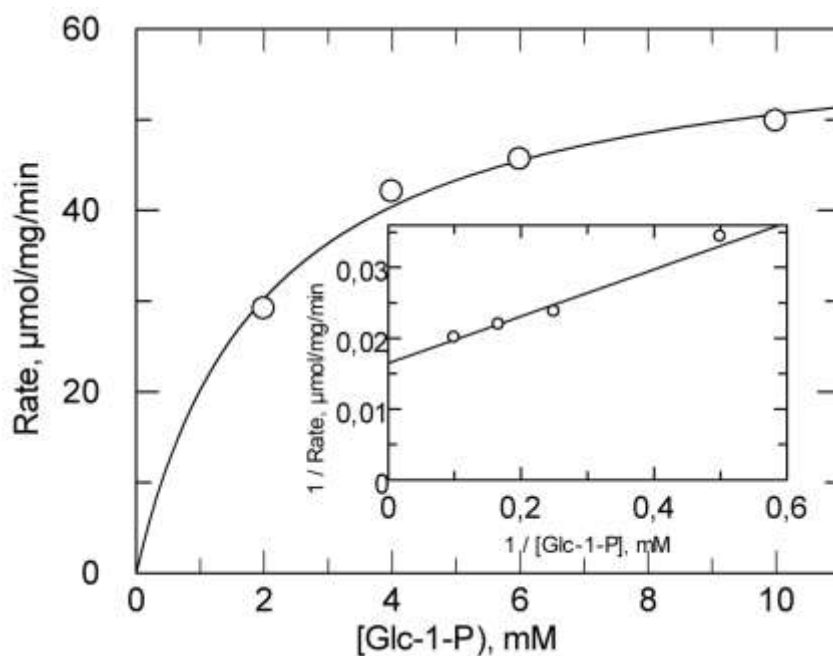


Κατά την πορεία των πειραμάτων, στόχος ήταν η εύρεση της σταθεράς K_i ακολουθώντας την παραπάνω αναλυόμενη διαδικασία για τον προσδιορισμό της. Όσο πιο υψηλή είναι η τιμή της K_i , τόσο ασθενέστερα συνδέεται ο αναστολέας με το ενεργό κέντρο του ενζύμου της φωσφορυλάσης και άρα αυξάνεται η ταχύτητα σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης φωσφορικών ιόντων.

Παράλληλα, πριν τον προσδιορισμό της K_i έπρεπε να υπολογιστεί η τιμή της K_m , για το συσχετισμό της συγγένειας του υποστρώματος με το προς μελέτη ένζυμο. Μια μικρή τιμή K_m υποδηλώνει πως το ένζυμο απαιτεί μόνο μικρή ποσότητα υποστρώματος για να κορεστεί, οπότε η μέγιστη ταχύτητα επιτυγχάνεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Αντίστοιχα, μια υψηλή τιμή K_m απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος προκειμένου να υπάρξει η μέγιστη ταχύτητα στην αντίδραση. Η σταθερά K_m για τη μυική φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι υπολογισμένη μεταξύ των τιμών 1mM και 2.5mM.

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου υπολογίστηκαν πειραματικά πως είναι: **$K_m=2,0140 \pm 0,3339$ mM** και **$V_{max}= 60,7522 \pm 2,9565 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$** . Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το διάγραμμα της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, sp.activity, μmol φωσφορικών /min*mg ενζύμου). Απεικονίζεται η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης (2.0,4.0,6.0,10.0

και 20.0 mM) στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του AMP 1mM και γλυκογόνου 1% w/v. Η σχηματιζόμενη υπερβολή δείχνει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Το μικρότερο εσωτερικό διάγραμμα είναι το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk της σχέσης του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.



4.3 Κινητική Μελέτη του αναστολέα

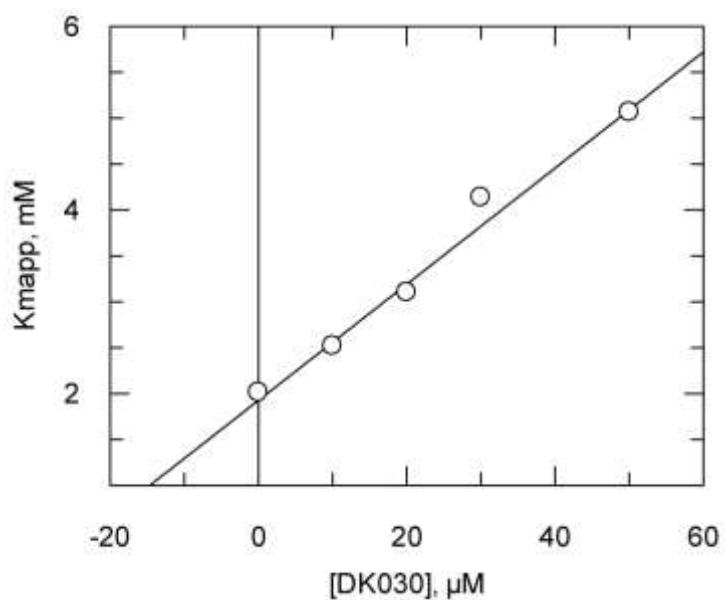
Μελετήθηκε η παραγωγή προϊόντος της αντίδρασης ($\mu\text{mol Pi /mg ενζύμου}$) σε συνάρτηση με το χρόνο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα κάθε φορά.

- **Για 10μM KD030** υπολογίστηκε πως: $K_{map}=2,5210 \pm 0.2417 \text{ mM}$
- **Για 20μM KD030** υπολογίστηκε πως: $K_{map}=3,1063 \pm 0,2146 \text{ mM}$

➤ Για 30μM KD030 υπολογίστηκε πως: $K_{map}=4,1381\pm0,4513$ mM

➤ Για 50μM KD030 υπολογίστηκε πως: $K_{map}=5,0681\pm0,5533$ mM

Η σταθερά αναστολής, K_i για την ένωση KD030 βρέθηκε $32,49\pm3,17\mu\text{M}$. Στο σχήμα απεικονίζεται η K_{mapp} ως προς τις υπο μελέτη συγκεντρώσεις του αναστολέα.



5. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η σύνδεση ενός χημικά συντιθέμενου μορίου αναλόγου της γλυκόζης, του KD030, στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η μελέτη έλαβε χώρα στα πλαίσια της ευρύτερης προσπάθειας που γίνεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη μελέτη πιθανών ενώσεων αναλόγων της γλυκόζης που θα μπορούσαν να αναστείλλουν τη δράση του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η οποία αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη εν δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων.

Η ένωση KD030 που χρησιμοποιήθηκε ως αναστολέας εμφανίζει μέτρια ανασταλτική δράση στο ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με μία τιμή **Ki 32,49±3,17μM** με δεδομένο πως η γλυκόζη, που είναι ο φυσικός αναστολέας του ενζύμου, έχει σταθερά αναστολής 2,5mM. Εκκρεμούν ακόμη κρυσταλλογραφικές μελέτες ώστε να βρεθεί ο τρόπος με τον οποίο η ένωση προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει τόσο με αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης αλλά και μόρια ύδατος ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής . Τέλος, έπονται ex vivo μελέτες της ένωσης σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, για μελετηθεί η ανασταλτική ισχύς του εκχυλίσματος και σε κυτταρικό επίπεδο,

Βιβλιογραφία:

Ελληνική

- **Σμοκοβίτης Α.**, (2004), Φυσιολογία, Έκδοση 4η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- **Stryer L.**, (1997), Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 2η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- **Οικονομάκος Ν. Γ.** (1977). Χημική τροποποίηση ενός αλλοστερικού ενζύμου, Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- **McMurry J.** (2001). Οργανική Χημεία, Τόμοι Ι & ΙΙ, Έκδοση 2η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- **Γεωργάτσος Ι.Γ., Γιουσάνης Τ.Α., Κυριακίδης Δ.Α.**(2001) Ενζυμολογία, Εκδόσεις Ζήτη,Θεσσαλονίκη.
- **Ιωάννης Κλώνης**,(2010),Ενζυμική Βιοτεχνολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Ξένη

- **Johnson L. N. & Hajdu J.**, (1989), Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals, Biophysics & Synchrotron Radiation, Hasnain S. ed, 142-155, Ellis Horwood, Chichester
- **Cori C. F. & Cori G. T.**, (1936), Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new ester, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 34, 702-705
- **McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L.**, (2000), Essentials of Exercise Physiology, Τόμος Ι, Έκδοση 2η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.

- **Oikonomakos N. G., Melpidou A.E & Johnson L. N.,** (1985), Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalic characterization, *Biochem. Biophys. Acta*, 832, 248-256
- **Oikonomakos, N.G.** (2002), Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586
- **Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P.,** (2002), The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'-b-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696.
- **Oikonomakos, N. G.; Somsak, L.** *Curr. Opin. Invest. Drugs* (2008), 9, 379.
- **Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.** (2008), New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983
- **Lehninger.**(2008) *Principles of Biochemistry*, Nelson D.L., Cox M.M., 5th Edition W.H. Freeman and Company, New York
- **Witters L. A. & Avruch J.,** 1978, Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase, *Biochemistry*, 17, 406-410.
- **Allan Marks, Michael A Lieberman,** "Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach", 2009
- **Palm D, Klein HW, Schinzel R, Buehner M, Helmreich, EJM** (February 1990). "The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis". *Biochemistry* 29 (5): 1099–1107

